

# 국내 재배 두충의 잎, 가지, 열매 및 껍질을 이용한 당뇨조절 식품소재 개발

Development of antidiabetic biomaterials from the  
leaves, rami, fruits and barks of *Eucommia ulmoides*

연 구 기 관  
한국식품개발연구원

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 재배 두충의 잎, 가지, 열매 및 껍질을 이용한 당노조절 식품소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 11월

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 김 혜영

세부연구책임자 : 류 미라

연 구 원 : 강 문희

연 구 원 : 김 경

협동연구기관명 : 강릉대학교

협동연구책임자 : 윤 정로

# 요 약 문

## I. 제 목

국내 재배 두충의 잎, 가지, 열매 및 껍질을 이용한 당노조절 식품소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

두충은 국내 재배 농가를 보호하기 위하여 1993년부터 수급조절 대상 품목으로 분류되어 수입이 금지되고 있다. 그러나 1997년 IMF(국제통화기금) 도입, 경기 불황 및 한정된 용도 등으로 두충의 국내 소비량은 급격히 감소하여 국내에서 생산된 물량이 다 소비되지 못하고 있다. 국내 수요량은 1997년 이전에는 약 1,500-2,000 ton이었으며 1998년에는 1,000 ton 미만으로 예상되는데 반하여, 1996년 이후 연간 생산량은 2,500 ton이어서 국내 수요량을 충족하고도 남아도는 실정이어서 두충의 이용 기술 개발의 필요성이 대두되었다. 국내에서 재배되는 두충의 경쟁력과 생산성을 향상시키기 위하여는 기존에 나무껍질을 건조하여 이용하는 것 이외에 매년 농산물로서 수확할 수 있는 잎, 가지, 열매 등도 이용하며, 단순 건조나 가공 방법이 아닌 부가가치 창출을 위한 가공 기술의 개발이 필요하다. 두충의 새로운 용도의 하나로서 최근 두

층잎을 차로 가공하여 판매하고 있으나 풍미가 좋지 못하여 녹차에 비하여 선호되지 못하고 있다.

당뇨병의 예방과 치료를 위한 기능 식품 소재로서는 전세계적으로 식이섬유와 올리고당의 개발이 주되었으나, 식이섬유와 올리고당은 당뇨조절기능에만 주효하지 않고 정상효과, cholesterol 저하효과, 항암효과 등 포괄적인 건강증진효과를 나타낸다. 의학 분야에서는 지난 수십년에 걸친 연구로부터 당뇨병의 발병 및 그 합병증 진전 기작이 구명되었다. 이 기작을 이용하여 당뇨조절 소재를 개발하면 효율적 당뇨병 관리가 이루어질 수 있으며 그 원료 농산물은 막대한 부가가치를 창출할 수 있으나 국내에서는 아직 시도되지 못하고 있다.

그러므로 본 연구는 두층의 부가가치 향상을 위하여 두층으로부터 당뇨조절 식품 소재 제조 기술에 관한 연구를 수행하였다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내에서 재배되는 두층으로부터 당뇨 조절 성분을 분리하여 그 특성을 구명하며 생체내 효과를 확인함과 동시에, 두층을 이용하여 당뇨 조절 효과를 나타내는 소재 생산의 산업적 가공 공정을 확립함으로써, 두층을 활용한 당뇨조절 소재를 개발하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에 의하여 두층으로부터 3개의 당뇨 조절 성분을 구명하였으며 두층의 생체내 당뇨조절 효과를 확인하였다. 아울러 두층으로부터 당뇨조절 소재 가공의 산업적 공정을 확립하였다. 이 소재는 세 가지 방향에서 상품화 될 수 있을 것이다. 첫째는 건강한 사람이나 아직 당뇨병 환자라고는 할 수 없으나 혈당치가 위험한 사람들이 당뇨병으로 이환되는 것을 예방하는 목적의 식품소재로 이용되는 것이다. 둘째는 당뇨병으로 이환된 이후 합병증으로 이환되는 과정을 지연시키거나 예방하는 소재로 이용될 수 있다. 셋째는 당뇨병 합병증으로 이환된 환자들이 실명, 신장 질환, 절단, 조기 사망 등을 예방하는 소재로 활용될 수 있다.

여 백

## SUMMARY

This study was conducted to investigate the anti-diabetic components and *in vivo* effectiveness of *Eucommia ulmoides*, and to develop the manufacturing process for antidiabetic biomaterials from *E. ulmoides*. The antidiabetic activities of *E. ulmoides* were screened *in vitro* in the samples from various cultivating places. Three components were isolated from the leaves of *E. ulmoides* as anti-diabetic components. The structure elucidation of the isolated compounds was performed by spectroscopic (UV, IR, ESI-MS, 1D and 2D NMR), and chemical methods. The three compounds were also analyzed in rami, fruits and barks.

The three compounds and the extracts of leaves, rami, fruits and barks of *E. ulmoides* were tested their *in vivo* effectiveness in diabetic model animals. Their effect on postprandial glucose levels following intubation of starch (2.0 g/kg body weight) was evaluated in nondiabetic (S.D. and Zucker lean) and diabetic (Zucker fa/fa) rats. The peak plasma glucose level and total incremental glucose were significantly decreased following ingestion of starch when the compounds and the extracts were simultaneously intubated with starch. The effects of them were more pronounced in diabetic rats than in nondiabetic

rats.

The effect of long-term treatment of them on antidiabetic control following intake of them for 8 weeks was evaluated in ob/ob mice. They caused significant reduction of plasma glucose level and GHb than control.

The process of manufacturing the antidiabetic biomaterials from *E. ulmoides* was established. It could be utilized in the industrial scale.



## CONTENTS

1. Introduction .....	23
2. A study on the anti-diabetic compounds of <i>Eucommia ulmoides</i> .....	71
3. A study on in vivo anti-diabetic effectiveness of <i>Eucommia ulmoides</i> .....	122
4. Manufacturing process for anti-diabetic biomaterials from <i>Eucommia ulmoides</i> .....	149

여 백

# 목 차

제 1장 서 론 .....	23
제 1절 연구의 배경 .....	23
1. 두충의 식물학 .....	23
2. 두충의 생산 현황 .....	25
가. 국외 생산 현황 .....	25
나. 국내 생산 현황 .....	27
3. 두충의 성분 .....	31
4. 두충의 생체조절 작용 .....	36
가. 혈압 강하 작용 .....	36
나. 두충의 콜레스테롤 저하 작용 .....	41
다. 이노작용 .....	42
라. 두충의 당뇨 조절 작용 .....	44
마. 두충의 암치료 효과 .....	46
바. 스트레스 해소 작용 .....	48
사. 기력·집중력의 지속 .....	50
아. 요통과 디스크의 치료 .....	52

자. 비만 방지 .....	53
차. 숙취 방지 .....	55
카. 간장병 치료 .....	57
제 2절 연구의 필요성 .....	58
1. 기술적 측면 .....	58
2. 경제 산업적 측면 .....	59
3. 사회 문화적 측면 .....	62
제 3절 연구의 목적과 범위 .....	64
제 4절 참고 문헌 .....	65
제 2 장 두층의 당노조절 성분 구명 .....	71
제 1절 서론 .....	71
제 2절 재료 및 방법 .....	78
1. 시료 수집 .....	78
2. 추출물 제조 .....	78
3. 용매에 의한 분획 .....	79
4. 당노조절성분의 분리 .....	79
5. 당노조절성분의 구조 분석 .....	80

제 3절	결과 및 고찰 .....	80
1.	추출 수율 .....	80
2.	두충 추출물의 in vitro 혈당강하 작용 검증 .....	82
3.	두충 추출물의 in vitro 당뇨합병증 억제 작용 검증 .....	82
4.	두충으로부터 당뇨조절 성분의 분리 및 구조 분석 .....	85
가.	당뇨조절 성분의 분리 .....	85
나.	당뇨조절 성분의 구조 분석 .....	88
다.	EU-6의 구조분석 .....	108
라.	시료 중의 당뇨조절 성분의 함량 .....	116
제 4절	참 고 문 헌 .....	117
제 3 장	두충의 생체내 당뇨조절 효과 연구 .....	122
제 1절	서 론 .....	122
제 2절	재료 및 방법 .....	127
1.	연구 대상 .....	127
2.	연구 방법 .....	127
가.	혈당강하 효과 .....	127
나.	두충의 당뇨합병증 억제 효과 .....	129

제 3절 결과 및 고찰 .....	129
1. 두층의 생체내 혈당강하 작용 .....	129
가. 두층의 식후 혈당상승 억제 작용 .....	129
나. 두층의 당뇨합병증 억제 효과 .....	138
제 4절 참 고 문 헌 .....	144
제 4 장 두층을 이용한 당뇨조절 소재 생산 가공 공정 연구 .....	149
제 1절 서 론 .....	149
1. 추출 .....	149
2. 막분리 .....	151
3. 본 연구에의 적용 .....	163
제 2절 연구개발 내용 및 범위 .....	164
1. 연구재료 및 방법 .....	164
가. 시료 .....	164
나. Trap Filter .....	164
다. 추출조건 .....	165
라. Reverse Osmosis를 위한 전처리 공정 .....	165
마. Ultrafiltration System .....	165
바. UF Membrane .....	165
사. UF 공정조건 .....	166

아. 최적공정 TMP .....	166
자. 한외여과막의 세척 .....	166
차. Reverse Osmosis System .....	166
카. Freeze Drying .....	167
2. 연구 결과 .....	167
가. 추출조건의 설정 .....	167
나. Microfiltration .....	170
다. UF시 최적공정압력선정 .....	171
라. Ultrafiltration .....	171
마. RO시의 온도영향 .....	173
바. RO에 의한 농축 .....	173
사. 동결건조 .....	174
아. 종합적 제조공정 검토 .....	175
제 3절 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의 .....	175
제 4절 참 고 문 헌 .....	186

여 백



## 표 차 례

표 1. 두충 수피의 연도별 국내 재배 면적 및 생산 현황 .....	30
표 2. 두충 수피의 연도별 수출입동향 .....	30
표 3. 두충나무 잎 및 수피의 성분 .....	32
표 4. 두충나무 잎에 함유된 iridoids .....	33
표 5. 두충나무 잎에 함유된 flavonoids .....	34
표 6. 두충나무 잎에 함유된 phenolic derivatives .....	35
표 7. 산지별 부위별 두충의 추출 수율 .....	81
표 8. 두충 추출물의 시험관내 혈당강하 효과 .....	83
표 9. 두충 추출물의 시험관내 당뇨합병증 억제 효과 .....	84
표 10. 두충엽의 용매 분획물의 시험관내 혈당강하 효과 .....	86
표 11. 두충엽의 용매 분획물의 시험관내 당뇨합병증 억제 효과 .....	86
표 12. Sephadex LH-20 column chromatography로 분획 후의 시험관내 혈당강하 활성 .....	87
표 13. Sephadex LH-20 column chromatography로 분획 후 당뇨합병증 억제 효과 ....	88
표 14. 두충나무 산지별 부위별 시료 중의 활성 물질의 함량 .....	116
표 15. 실험 식이의 조성 .....	128
표 16. 두충엽 투여가 S.D. rat에서 전분 부하 후 혈당치 변화에 미치는 영향 .....	130

표 17. 두충엽 투여가 S.D. rat에서 전분 부하 후 'Area under the curve'에 미치는 영향 .....	131
표 18. 두충잎 투여가 Zucker rat에서 전분 부하 후 혈당치 상승에 미치는 영향 .....	133
표 19. 두충잎 투여가 Zucker rat에서 전분 부하 후 'Area under the curve'에 미치는 영향 .....	134
표 20. 두충엽으로부터 분리한 성분이 전분 부하 후 혈당치 상승에 미치는 영향 ..	135
표 21. 두충으로부터 분리한 성분이 'Area under the curve'에 미치는 영향 .....	137
표 22. 두충 추출물 투여쥐의 체중 변화 .....	139
표 23. 두충 추출물 투여가 ob/ob mice의 식이 섭취량 및 장기 무게에 미치는 영향 .....	139
표 24. 두충잎 투여가 ob/ob mice의 GHb 함량에 미치는 영향 .....	140
표 25. 두충잎 투여가 안구 수정체 단백질의 변화에 미치는 영향 .....	141
표 26. 두충 추출물의 투여가 ob/ob mice의 혈장 콜레스테롤, 중성 지방, $\beta$ -hydroxybutylate, lactate 함량에 미치는 영향 .....	142
표 27. EU-1, EU-4 및 EU-6의 투여가 GHb 함량에 미치는 영향 .....	143
표 28. EU-1, EU-4 및 EU-6의 투여가 crystallin의 변화에 미치는 영향 .....	144
표 29. 용매/추재비에 따른 추출된 Eu-1의 함량 및 용매 회수율 .....	170

## 그림 차례

그림 1. EU-1의 EI mass spectrum .....	91
그림 2. EU-1의 FAB mass spectrum .....	92
그림 3. EU-1의 <sup>1</sup> H-NMR spectrum .....	93
그림 4. EU-1의 <sup>13</sup> C-NMR spectrum .....	94
그림 5. EU-1의 DEPT NMR spectrum .....	95
그림 6. EU-1의 COSY spectrum .....	96
그림 7. EU-1의 HMQC spectrum .....	97
그림 8. EU-1의 HMBC spectrum .....	98
그림 9. EU-4의 EI mass spectrum .....	101
그림 10. EU-4의 FAB mass spectrum .....	102
그림 11. EU-4의 <sup>1</sup> H-NMR spectrum .....	103
그림 12. EU-4의 <sup>13</sup> C-NMR spectrum .....	104
그림 13. EU-4의 COSY spectrum .....	105
그림 14. EU-4의 HMQC spectrum .....	106
그림 15. EU-4의 HMBC spectrum .....	107
그림 16. EU-6의 EI mass spectrum .....	109

그림 17. EU-6의 FAB mass spectrum .....	110
그림 18. EU-6의 <sup>1</sup> H-NMR spectrum .....	111
그림 19. EU-6의 <sup>13</sup> C-NMR spectrum .....	112
그림 20. EU-6의 COSY spectrum .....	113
그림 21. EU-6의 HMQC spectrum .....	114
그림 22. EU-6의 HMBC spectrum .....	115
그림 23. Flow diagram of ultrafiltration system .....	176
그림 24. Flow diagram of reverse osmosis system .....	177
그림 25. Effect of solvent-feed ratio on the total content .....	178
그림 26. Effect of solvent-feed ratio on EU-1 content of the extract .....	179
그림 27. Change of EU-1 content in the extract with the solvent-feed ratio during extraction .....	180
그림 28. Permeate flux with TMP as a function of retentate flow rate .....	181
그림 29. Permeate flux as a function of concentration factor with various ..	182
그림 30. Eu-1 concentration and permeate flux as a function of concentration .....	183

그림 31. Permeate flux as a function of TMP with various temperature  
.....184

그림 32. Eu-1 concentration and permeate flux as a function of concentration  
.....185

여 백

# 제 1 장 서 론

## 제 1절 연구의 배경

### 1. 두충의 식물학

두충(*Eucommia ulmoides* Oliver)은 식물분류학상 杜冲科(*Eucommiaceae*)에 속하는 낙엽활목으로서 전세계적으로 1속 1종이 분포한다. 중국이 원산으로 국내에는 1926년에 도입된 수종이며 약용적 가치가 높아 전국에서 재배한다. 지금까지 알려진 가장 오래된 약초 중에 하나로 중국에서는 두충의 의학적 가치가 수천년 동안 인정되고 있다.

일반적으로 두충나무의 껍질을 두충이라 하며 수피를 두충(杜仲) *Eucommiae Cortex*라 한다. 두충나무의 수피와 잎에는 gum의 일종인 gutta percha가 다량 함유되어 있으며 알칼로이드, 펙틴, 레진, 유기산 등과 함께 ligand류의 화합물인 caffeic acid, chrologenic acid, tannin 등이 함유되어 있는 것으로 보고된다. 수령이 30년 가까이 되면 은행나무처럼 높이 20m의 거목으로 자란다. 두충의 나무껍질은 고대 중국에서부터 한방 약재로서 소중히 여겨져 왔으며 또한 중국 서민들 사이에서는 어린잎을 불에 쪄서 말려 두충차를 만들어 마시는 것을 건강 장수의 선법(仙法)으로 삼는 풍습이 있

다.

두충은 은행나무처럼 암수 딴 그루이며 두충잎은 느릅나무잎과 비슷한 타원형이다. 높이가 10m에 달하며 잎은 타원형이고 끝이 뾰족하며 고르지 않은 톱니가 있다. 꽃은 4-5월경 엷은 녹색으로 피며 자웅이주로서 수꽃은 적갈색이며 6-10개의 짧은 수술이 있고, 암꽃은 짧은 자루에 1개씩 붙는다. 열매는 날개가 있고 긴 타원형으로 편평하며 끝 부분이 오목하게 들어간다. 봄에 작은 흰 꽃이 피며 수피를 자르면 고무나무처럼 흰색의 고무질 유액이 흐른다. 씨를 뿌려 일 년이면 묘목이 되는데 재배하는 경우 발아율은 30% 정도이다. 묘목은 100 제곱 미터당 100그루를 심는 게 이상적이며, 3년째에는 사람의 키를 넘을 정도로 성장한다. 병충해와 세균, 박테리아에 강하며 방충제 같은 농약을 살포하지 않아도 속속 잘 자란다. 산성 토양을 싫어하지만 토양 개량 이외에는 손을 쓸 필요가 없는 생력(省力) 재배형 식물이다. 나무껍질은 15~16년이 지나야 채취할 수 있으며 어린잎은 2년째부터 수확할 수 있다.

생약으로 판매되는 두충은 두충나무 껍질인데 표면은 회갈색으로 꺼칠꺼칠하며 안쪽은 어두운 자갈색으로 매끈매끈하다. 이것을 자르면 은백색의 고무 상태의 실이 꼬리를 물며 나오는 것을 볼 수 있다. 두충의 별명인 목면(木綿)이라든가 사연피(絲連皮) 등은 이 고무 상태의 실에서 유래된 것이다(Hu, S. Y, 1978).

두충이 우리나라에 처음 전해진 때는 고려 문종 33년(1079년)으로 문종이 자신의 병을 치료하기 위하여 송나라에 약재를 청하였는데 송나라에서 두충을 보내왔다고 역



사에 기록돼 있다. 그러나 두충이 우리 나라에 실제로 재배되기 시작한 것은 불과 60년 전인 1930년 이후이다. 이 식물의 잎과 수피는 기호 음료로 사용되고 있으며 신농본초경의 상품에 수재되어 있고 강장, 이노, 안태의 효능으로 고혈압, 소변불리, 습관성 유산, 하복통 등에, 두충 엽도 하열, 이노 효능으로 고혈압 등의 치료에 사용되고 있다. 그러나 수피를 사용하는 경우에는 자원의 재생산이 어렵게 되므로 자원개발 측면에서 잎이나 가지 등을 사용하여 여러 종류의 건강 소재가 개발되어야 한다.

두충나무는 국내 여러 지역에서 재배되고 있다. 이 식물의 약리 성분으로는 iridoid, cyclopentanoid, dilignan-glycoside, gutta percha, flavonoid 등이 알려져 있다.

## 2. 두충의 생산 현황

### 가. 국외 생산 현황

중국의 사천, 호북에서 자라는 낙엽 활엽 키 큰 나무이나 현재 자생목은 적고, 중국 중남부 각성일대에서 널리 재배하는 중국 특산 식물이다. 중국의 서북부지방이 원산지로 사천, 귀주가 주산지이며 장강성, 호북성, 사천성, 귀주성과 하남성, 협서성 등이 있는 중앙산악지대에 주로 분포하고 있다. 품종은 원두충(唐杜冲)이라 하여 중

국과 우리 나라에서 재배되고, 대두충(臺杜冲)은 대만에서, 일두충은 일본에서 재배되고 있다. 화두충은 사철나무 껍질을 말하며 일두충과 화두충이 당두충 보다는 약효가 떨어진다. 의학계에서 두충의 이용은 중국 고대 시대부터로 알려져 있으나 약학적 정보는 1950년대 수행된 과학적 조사를 통해 널리 알려지게 되었다. 이렇듯 과학적 정보가 없이도 1500여 년간 민간약용으로 이용했다는 것은 매우 흥미로운 일로 두충이 건강에 좋고 유해물질이 아니라는 것이 오랜 경험을 통해 전해 내려져 왔기 때문이다. 1950년대에 중국에서 두충에 대한 연구와 조사 이후로 식물 배양조건과 약재로써 이용될 수 있는 방법 및 실험, 그리고 임상적 적용 등에 대한 여러 새로운 정보가 밝혀짐에 따라 최근 몇 년 중국 정부는 산업적 의학적 적용을 위하여 두충 생산을 강조하고 있다. 오랜 경험을 바탕으로 양질의 두충 조건으로는 잎이 넓고 일정한 크기를 가지며 갈라진 틈 없이 촘촘히 나열된 부드러운 것이 좋으며 크기가 작고 가늘며 상처가 있고 내부 표면에 물기를 가지고 점이 있는 것은 질이 나쁜 것으로 구별한다. 두충 껍질을 부숴 보면 실과 같은 것이 줄줄 떨어져 나온다. 이렇게 섬유질이 많은 약들이 대개 그러하듯 두충도 활동력이 상당히 좋아 마치 도랑 치듯 막힌 조직에 가서 순환을 도와 기능을 원활하게 한다. 또 껍질 속이 특이하게 검은 색을 띠는 것으로 두충이 근골격 계통에 특히 잘 작용하는 약임을 알 수 있다. 중국에서 두충은 북부 쑤촨(Szechuan)의 광안(Kuang-yuan), 파청(Pa-chung)으로부터 생산된 쑤청(Chuan-chung)이 질 좋은 것으로 분리되는데 이것은 얇은 수피를 가지며 부드러운 표

면과 내부에 갈색의 색을 띤다. 고품질의 쉐청은 다시 4가지 등급으로 분리되는데 1등급으로 쉐청(Shen-chung)이 있고 2등급으로 푸청(Fu-chung), 3등급에는 루청(Lu-chung), 4등급으로는 슈청(Shou-chung)이 생산되며 아시아를 중심으로 수출되고 있다. 두충은 씨의 형태로 중국에서 프랑스로 처음으로 선교사에 의해 소개되었으며 1895년 자연 역사 박물관에 *Eucommia ulmoides* Oliver로서 공식화되었다 (Hu, S. Y, 1978).

#### 나. 국내 생산 현황

두충의 원산지는 중국이다. 우리 한의학계에서는 옛날부터 전량을 수입하여 사용해 왔는데 지금부터 약 70년 전에 서울 홍릉 수목원에 처음 심었던 나무가 씨를 퍼뜨린 것이 이제는 전국에서 재배되어 충분히 자급자족되므로 비교적 싼값에 일반에게 보급되고 있다. 두충은 1993년부터는 국내 재배 농가를 보호하기 위하여 농림부에 의해 수급조절 대상 품목으로 분류되어 수입이 금지되고 있다.

그러나 '97년 IMF(국제통화기금) 도입과 경기 불황으로 두충나무 껍질의 국내 소비량은 급격하게 감소하여 국내 생산량이 남아도는 실정이다. 국내 수요량은 '97년 이전에는 약 1,500-2,000 ton이었으며 '98년에는 1,000 ton 미만으로 예상되는데 반하여, '96년 이후 연간 생산량은 2,500 ton이어서 국내 수요량을 충족하고도 남아도

는 실정이어서 두층의 이용 기술 개발의 필요성이 대두되었다. 국내에서 재배되는 두층의 경쟁력과 생산성을 향상시키기 위하여 기존에 나무껍질을 건조하여 이용하는 것 이외에 매년 농산물로서 수확할 수 있는 잎, 가지, 열매 등도 이용하며, 단순 건조나 가공 방법이 아닌 부가가치 창출을 위한 가공 기술의 개발이 필요하다. 두층의 새로운 용도의 하나로서 최근 두층잎을 차로 가공하여 판매하고 있으나 풍미가 좋지 못하여 녹차에 비하여 선호되지 못하고 있다.

두층은 국내에서 전국적으로 재배되고 있으며 주재배지는 경남 거창, 산청, 하동, 함안을 비롯한 경기도 연천, 강원도 홍천, 충북 청원, 경북 의성, 전남 임실 등이다. 농림부의 품목별 생산실적 통계에 의하면 두층은 1989년 이전에는 연간 생산량이 170 ton에 불과하다가 국내 소비가 급증하자 중국으로부터의 수입에 국내 소요량의 대부분을 의존하다가 국내 재배가 활발해져서 그 생산량이 급증하고 있는 실정이며(표 1). 다행히 국내 기후와 토질은 두층 재배에 적합하여 다량 생산이 가능하여 그 활용도만 증대된다면 유휴 농지 및 임야지를 활용하여 그 재배량을 무한정 증가시킬 수 있다. 또한 두층은 다년생 작목이므로 재배기간이 증가할수록 잎, 껍질 등의 수확량이 증가하는 장점이 있다.

국내 생산, 소비, 수출입 동향을 살펴보면 두층나무는 중국 원산 식물로 키는 15m, 줄기의 직경은 40cm정도까지 자라며 잎이 넓고 가을에 잎이 떨어진다. 재배적지는 표토가 깊고 배수 양호한 사질양토로 전국 어디에서나 재배가 가능하다. 종자번식

을 하며 10a당 150본 정도의 종묘가 소요되며 수확은 8~12 년생을 7~8월에 한다. 전국의 재배면적은 '92년 이후 94년까지는 매년 2배정도씩 증가하였지만, '95년부터 감소하기 시작하였으며, '98년의 전국재배면적은 1,325ha이다. 주산지는 경남 산청, 전북 임실, 충북 청원 등이다.

국내 소비는 주로 잎과 종자가 강장약으로 사용되고 있으며 차나 담배로 가공 이용되기도 한다. 한약에서 당두충, 원두충이라고 하는 것은 화두충과 구별하기 위해서 만든 이름이다. 약리작용으로 혈압강하, 진정, 진통작용이 있다고 알려져 있다. 주요 성분으로는 Pinoresinol, Olivil 등이 있다. 수출입 정도는 '93년 21톤 정도 수출되었으나 '94년 실적은 없으며 '95년 10톤 정도가 수입되었다. 국내에서는 두충의 생체 조절기능을 이용한 식품소재 제조 기술에 관한 특허는 등록된 바가 없으며, 일본에서는 인삼, 은행잎, 두충잎의 혼합 추출물에 의한 불면증 치료 건강식품 제조 특허 및 인삼과 두충잎의 혼합물에 의한 간 질환 및 암 치료용 식품소재 제조 기술 특허가 등록되었다. 그러나 아직까지 두충나무에 대한 증식법이나, 묘목생장 그리고 수량증가에 다른 수피와 잎의 생산력은 정립되어 있지 못한 실정이다. 또한 용도가 다양함에 따라 재배면적도 증가되고 있으나 표준재배 기술이 확립되어 있지 않아 현재까지 두충나무에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

표 1. 두충 수피의 연도별 국내 재배 면적 및 생산 현황

구분	재배 면적 (ha, %)			생산량 (M/T, %)		
	전국 (A)	경남 (B)	B / A	전국 (A)	경남 (B)	B / A
'92	423	-	-	385	-	-
'93	819	239	29.2	695	69	9.9
'94	1,637	411	25.1	1,366	122	8.9
'95	1,593	405	25.4	1,649	115	7.0
'96	1,484	268	18.1	2,680	348	13.0
'97	1,575	430	27.3	2,489	153	6.1
'98	1,325	204	15.3	2,652	102	3.8
'99	1,140	219	19.2	2,177	320	14.7

※ 자료 : 특용작물 생산실적(농림부).

표 2. 두충 수피의 연도별 수출입동향 (단위 : T, 천\$)

구분	수출			수입		
	물량	금액	주요수출국	물량	금액	주요수입국
'93	4	16	일본	87	494	중국
'94	-	-	-	63	380	"
'95	-	-	-	68	353	"
'9	-	-	-	146	550	"
'97	-	-	-	73	275	"
'98	-	-	-	1	2	"
'99	5	39	중국	-	-	-
2000	-	-	-	12	14	중국

※ 자료 : 국내외수출입통계(2000, 농수산물유통공사)

### 3. 두충의 성분

두충나무 잎 및 수피의 일반 성분은 표 3과 같이 보고되었다. 대표적인 생체조절 성분은 pinoresinol diglucoside이며, 이는 잎 및 수피에 존재하며, 항고혈압 성분, 혈관을 급속히 확장·진정시키는 한편, 진통·진정 효과를 지닌 유효 성분이며, 신경안정제로도 이용되고 있다. 또 gutta-percha가 있으며 이는 두충 수피의 고무 상태의 물질이며 위벽을 보호하고 비타민 C, 탄닌이 위액의 과다한 분비를 억제하며 류머티스, 신경통 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Deyama, T., 1986). 이외에 iridoids (표 4), asperuloside, asperulosidic acid, deacetyl asperulosidic acid, acandoside 10-O-acetate, geniposidic acid, flavonoids(표 5), phenolic derivatives, terpenoids (ursolic acid, ulmoidol)등이 함유된 것으로 보고되었다.

표 3. 두충나무 잎 및 수피의 성분(mg%)

종 류	잎의 성분	수피의 성분
배 당 체	0.072	0.142
알칼로이드	0.028	0.066
펙틴	7.3	6.5
지방	2.2	2.9
수지	1.48	1.76
유기산	1.49	0.25
케톤	3.6	2.15
알도즈	0.95	-
비타민C	48.1	20.7



표 4. 두충나무 잎에 함유된 iridoids

1. eucommiol

2. 1-deoxyeucommiol

3. epieucommiol

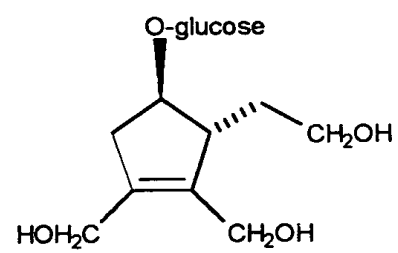
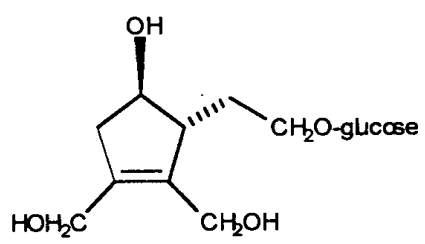
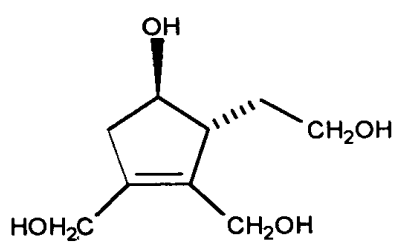
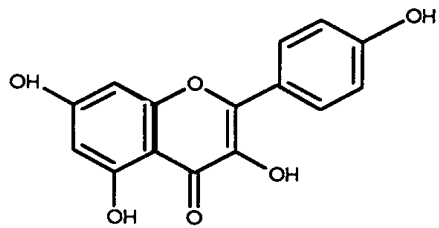


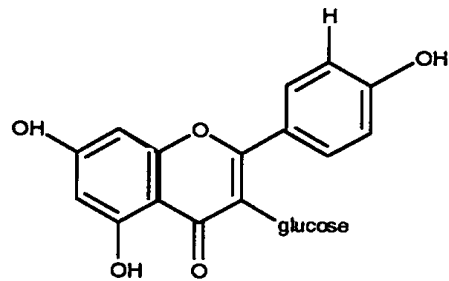
표 5. 두충나무 잎에 함유된 flavonoids

1. kaempferol

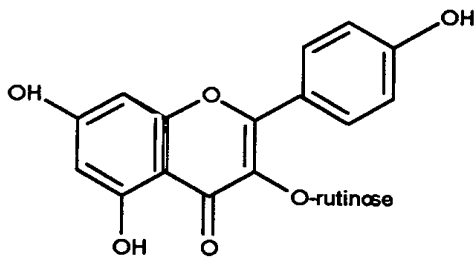


2. astragarin

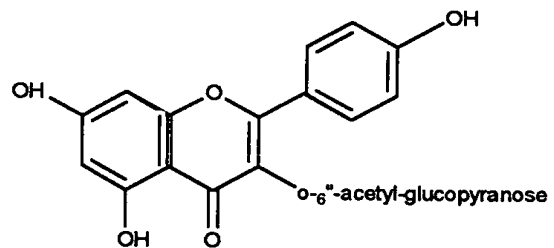
(kaempferol 3-glucopyranoside)



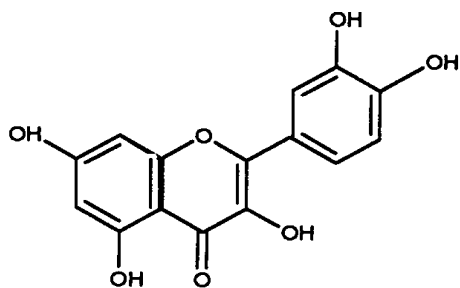
3. kaempferol-3-rutinoside



4. kaempferol-3-O-(6''-acetyl)  
-glucopyranoside

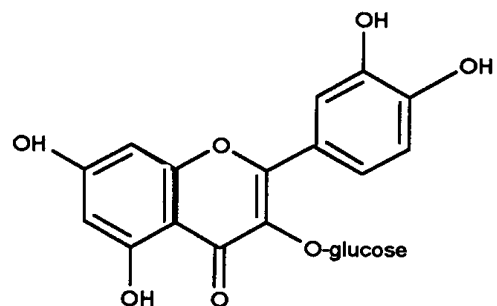


5. quercetin



6. Isoquercitrin

(quercetin-3-O-glucoside)



7. quercetin 3-O-xylopyranosyl-(1→2)-glucopyranoside

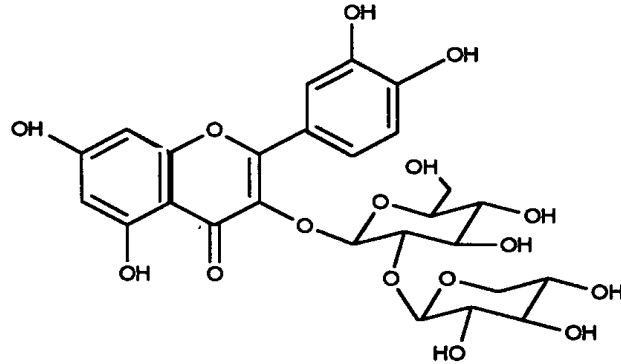
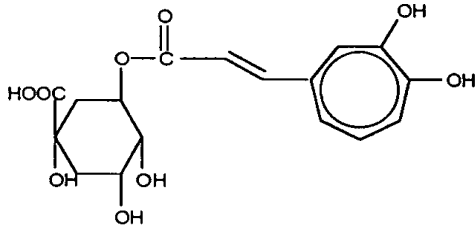
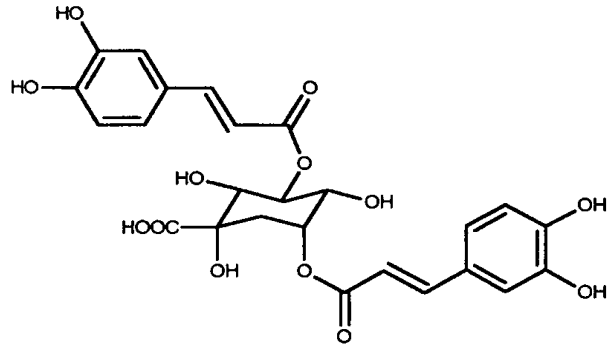


표 6. 두충나무 잎에 함유된 phenolic derivatives

1. chlorogenic acid



2. 3,5-di-O-caffeoylquinic acid



3. pyrogallol

4. protocatechuic acid

5. *p-trans* coumaric acid

#### 4. 두충의 생체조절 작용

##### 가. 혈압 강하 작용

중국은 수천 년의 역사를 가진 한방(전통 의학)을 중요시하여 한방 약재의 임상 연구에 있어서도 세계적으로 최고 수준에 올라 있다. 최근 들어 중국 정부는 의학 기술 개발의 기본을 (중의학과 서양 의학의 결합)에 두고 정력적으로 연구를 진행하고 있다. 그러한 중국 의학계에서 두충의 유효 성분, 즉 사포닌에 대해서 한방 처방에서 빼놓을 수 없는 성분을 다중구조(多重構造)로 갖고 있다고 판정하였다. 물론 이를 입증하기 위해 중국은 다양한 임상 실험을 거쳤다. 두충 원산지의 하나인 남경(南京)에 있는 의과대학의 강소신의학원(江蘇新醫學院) 부속병원에서는 고혈압 환자 119명에게 두충의 10% 알콜 추출액을 하루 3회, 1회에 30방울씩 1개월에서 1년간 복용시켜 그 경과를 추적했다. 그 결과 현저한 효과가 있었던 환자가 51명(42.8%)에 달했고 효과가 발견된 환자가 15명, 효과가 없었던 환자가 53명(44.6%)이었다. 합계 유효율 55.4%, 평균 치료 기간은 9개월이었다. 또 다른 임상보고는 초기 고혈압 환자 124명에게 두충의 5% 알콜 추출액을 하루 3회, 1회에 1ml씩 복용시켰더니 44명이 45일만에 정상 혈압으로 돌아왔다. 이 병원에서는 고혈압의 예비 증상인 두통, 현기증, 이명, 불면증 등의 자각 증상 개선에 대해서도 실험했는데 이에 따르면 두충의 투여에 의해

전체 환자의 82.5%가 그 개선 효과를 보고하고 있다. 고혈압을 서양 의학으로 치료하는 경우 고혈압 환자의 80~90%를 차지하는 본능성 고혈압의 치료는 장기간에 걸쳐, 거의 일생 동안 계속하지 않으면 안 된다. 치료에 따르는 마이너스 요소, 특히 강압제의 부작용과 장기 통원의 번거로움을 생각하면 역시 강압제에 의지하지 않고 혈압을 낮추는 것이 가장 좋은 치료법이다. 두충은 바로 그러한 효능을 갖고 있다. 실제로 고혈압은 몸 속의 여러 기능의 균형이 깨져 나타나는 증상이므로 단순히 약으로 혈압을 낮추기만 하면 되는 병이 아니다. 물론 혈압을 낮추지 않으면 뇌졸중의 위험이 있으므로 강압제가 필요한 때도 있지만 강압적으로 급속히 혈압을 낮추면 구역질, 현기증이 수반돼 환자는 생활의 활력을 잃게 된다. 고혈압을 앓고 있는 노인 중에는 노망과는 달리 활동하거나 말하는 것도 힘들어하는 사람이 있는데 그것은 강압제의 연용에 의한 경우가 많다. 또한 동맥경화인 사람은 혈압을 너무 낮춰 뇌와 장기에 필요한 혈액량이 공급되지 못함으로써 위험에 빠지게 되는 경우도 있다.

최근 미국에서는 두충에 대한 성분 연구가 활발하다. 이는 미국인의 사망 원인 1위를 고혈압과 심근경색 등 순환기 계통의 질환이 차지하고 있기 때문이다. 미국인의 과식에 의한 비만이 그러한 병을 초래하는 것인데 이에 대응하기 위해 두충이 선택된 것이다.

위스콘신 주립대학 의학부에서 실시한 실험에 의하면 두충의 추출액은 다음과 같은 분자 구조를 갖고 있으며 OR 부분의 성분에 피노레지놀 다이글루코사이드

(Pinoresinol diglucoside)를 함유하고 있다는 것이 밝혀졌다. 또한 미국 정부의 최근 의약 분석에서 두충에는 피노레지놀 다이글루코사이드라는 물질이 들어 있고 이것이 아주 미량이긴 하나 혈압 강하 작용에 큰 역할을 하는 것이 판명되었다고 보고하고 있다.

두충의 혈압강하 작용은 오래 전부터 알려져서 민간요법으로 사용되어져 왔으며 동물 실험 및 임상실험에 의하여 과학적으로 입증되고 있다. 본태성 고혈압 쥐 (spontaneously hypertensive rat: SHR)에게 1% 식염이 함유된 사료와 함께 두충 추출물을 4주간 투여하였을 때 혈압 상승을 억제하는 작용이 있었으며 호흡, 순환기계, 중추신경계에는 영향을 미치지 않았다. 두충 추출물을 정맥에 투여하여 흰쥐의 급성 강압 작용에 대한 실험에서 정상쥐에서는 혈압의 변화가 적었지만 혈압이 높은 SHR에서는 현저히 혈압을 낮추는 것이 보고되었다. 이것은 혈압이 높은 동물에 대해서 선택적으로 혈압을 낮추는 효과를 시사하고 있고 건강식품의 용도로서 폭넓은 이용이 기대된다. 건강한 일상 생활을 하는 남녀 (20세 이상 65세 미만) 103명을 대상으로 임상실험을 실시한 바에 의하면 피험자에게 두충 추출물이 포함된 음료와 두충 추출물을 포함하지 않고 맛과 색을 조정한 플라시보 음료를 8주간 복용시켰다. 실시기간은 외기 온도가 저하하여 혈압치가 상승하는 9-12월에 걸쳐서 실시하였다. 혈압의 측정은 자동혈압계로 2주에 한번 실시하였고 측정에는 시간을 두고 3회 측정했다. 그 외 자타각 증상, 혈액검사, 뇨검사 등의 임상 검사를 수시로 실시했다. 또 대상자 중

에 45명에게 음용전과 8주 후에 24시간 휴대형자동연속측정장치(ABPM-630)을 사용해 30분마다 상완(上腕)에서 측정했다. 그 결과 두충 추출물을 8주간 복용한 혈압이 높은 군에서는 음용개시기에 비해 유의적인 혈압강압작용을 보였다. 또한 플라시보음료를 준 혈압이 높은 군에서는 유의한 차이는 인정되지 않았다. 24시간 혈압측정에서는 활동 시간별로 비교해서 평균 1-3mmHg이 음용전에 비해서 유의적으로 저하되었다. 음용 후 8주째의 강압작용을 유용율(有用率)로 나타내면 확장기, 수축기가 -7mmHg이상의 혈압강하는 전체 피험자의 56%에서 보였고 -10mmHg이상의 혈압강하는 전체의 40%에서 보였다. 즉 사람에게 있어서도 완만한 혈압 강하 작용이 있다는 것이 증명되었다. 또한 일반 증상, 자타각 증상에서 이상은 보이지 않았고 임상 검사의 결과는 변동 범위내의 변화에 있었다. 그 외에 두충차를 사용한 강압임상약리는 중국의 2개 시설에서 실시되었다. 이 임상 보고에 있어서도 혈압강압의 유효성을 시사하고 있다. 또한 그 안정성 평가는 혈액학적 평가, 수반 증상, 심전도 등에 의해서 유해 작용은 없는 것으로 확인되었다(Metori, K.1997).

이러한 두충의 혈압에 미치는 영향에 대한 실험 결과는 시사하는 바가 크다. 고혈압 치료제로는 화학적으로 만들어진 강압제(이노강압약, 프로프라노롤, 메틸도파 등)가 이용되고 있는데 인체에 대한 속효력은 이것들이 강하지만 기립성 현기증, 위장장애, 알레르기 등의 부작용이 있기 때문에 장기간 사용하는 데는 무리가 따른다. 그러나 미국, 일본, 중국, 서독 등에서 한 임상 실험에서도 두충의 부작용은 전혀 발견

되지 않았다.

두충처럼 늘 계속 먹는 건강 차가 만일 조금이라도 부작용이 있으면 큰 일이지만 그럴 염려가 전혀 없다. 이 점이 자연 생약의 뛰어난 점이며, 이는 인간이 태고부터 자연에 순응하며 살아온 때문이라 할 것이다.

두충에 부작용을 수반하지 않는 강압 작용이 있다는 것은 혈압이 높은 중장년층과 심근경색, 협심증을 걱정하는 사람에게 큰 복음이다. 이런 질병은 몸의 상태를 불안하게 만드는 스트레스가 증상 악화의 원인이 될 때도 많은데 두충의 복용으로 체질 개선을 피하면 (약을 먹지 않고도 건강차로 체력을 회복했다)는 자신감을 얻을 수 있기 때문이다. 최근에는 서양 의학의 영역에서도 환자의 병후 관리를 위해 한방약과 양약의 병용을 권하는 의사가 늘고 있다. 한방약과 양약을 비교하여 볼 때, 특정 증상에 대한 빠른 효과는 적지만 균형 있게 몸 전체에 서서히 효과를 발휘하는 데 있어서는 양약이 한방약을 도저히 당할 수 없다.

중년의 경우 한 증상의 표면화는 다른 많은 증상의 일부분인 경우가 많다. 그러므로 화학요법으로 대증요법을 함께 병행하여 한방약으로 잠재하는 병인을 서서히 고치는 것이 중요하다. 실제로 장기적인 건강 유지를 위해서는 국소 요법만으로는 안 되는데 한방 약제는 한 가지 증상에만 효과가 있는 경우는 거의 없으며 다양한 증상을 종합적으로 치료한다.



## 나. 두충의 콜레스테롤 저하 작용

두충의 콜레스테롤 저하 작용은 비교적 최근에 알려지기 시작하였으며 주로 동물 실험을 통하여 입증되고 있다. 콜레스테롤 1%와 라드 12%를 첨가한 식이를 2주간 wistar rat에게 투여하여 혈장 및 간의 콜레스테롤 및 중성 지방 함량을 50%이상 증가시킨 후 두충추출물을 2주간 투여하였다. 그 결과 두충 투여군은 혈장 HDL cholesterol/total cholesterol 비가 유의적으로 대조군에 비하여 증가하였으며 혈장 중성지방, VLDL- 및 LDL-콜레스테롤은 유의적으로 감소하였다. 그러나 간의 acetyl CoA carboxylase와 fatty acid synthase 합성에는 영향을 주지 않아서 두충이 지방의 합성에 관여하여 콜레스테롤 저하 작용을 나타내지는 않는 것으로 사료되었다 (Nakasa, T. 1995). 두충은 식이에 의해 유도된 고콜레스테롤 혈증뿐만 아니라 인슐린 저항성으로 인한 이차적 고콜레스테롤 혈증에도 유효하였다. (Kim, H.Y., 2000). 즉 두충추출물을 식이에 5%(w/w)가 되도록 혼합하여 C57BL6/J-Lepdb(ob/ob) 및 C57BL6/J-Lepdb(ob/?) mice에게 6주간 투여하여 콜레스테롤 저하작용을 살펴보았다.

Ob/ob mice는 인슐린 저항성, 식욕증진, 고인슐린 혈증, 고혈당, 체온조절의 이상, 갈색지방 조직의 이상의 특징을 가지며 혈중 콜레스테롤 수치가 littermate인 ob/? control에 비하여 300% 상승한다. 두충의 섭취로 인한 실험군간의 체중, 식이섭취량, 간 중량의 유의적인 차이는 없었으며 신장 중량(g/100g 체중)은 두충 투여시 유의적으로 감소하였다. 두충 투여군은 대조군에 비하여 ob/ob mice의 혈중 콜레스테

콜레스테롤 20%, 중성 지방 농도를 13% 유의적으로( $p < 0.05$ ) 저하하였다. 간의 콜레스테롤치는 15%, 중성지방함량은 10% 유의적으로 저하하였다. 두층 투여에 의한 혈장 콜레스테롤 저하와 두층의 항산화 효과와의 연관성을 찾기 위하여 간 및 신장의 항산화 관련 효소 활성을 측정하였다. 결과 ob/ob mice에서 두층 투여군은 간의 지질 과산화물을 MDA 함량으로 측정하였을 때 대조군에 비하여 15% 유의적으로 저하시켰다. 두층은 간의 catalase, glutathione peroxidase activity를 유의적으로 증가시켰다. Ob/ob mice에서 두층 투여군은 신장의 MDA 함량을 대조군에 비하여 25% 유의적으로 저하시켰으며 신장의 catalase, glutathione peroxidase activity는 유의적으로 증가시켰다. 즉 두층 투여는 항산화 효과를 보였으며 항산화 관련 효소활성의 증가로 인한 지질 과산화 억제 효과였다. 두층은 실험 동물에서 콜레스테롤 저하 작용을 나타내며 그 작용 기작과 활성 성분에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다 (Kim, H. Y., 2000).

#### 다. 이뇨작용

건강에 있어 배설은 대단히 중요하다. 배설이 순조롭게 된다는 것만으로도 신체가 정상적으로 기능하고 있다는 신호가 된다. 변비와 소변 배설이 좋지 않으면 그만큼 노폐물이 체내에 남게 되어 두통, 현기증, 복통, 마비 등이 일어나기 쉽다. 이것들은 몸 속의 혈액이 탁해져 있다는 적신호로 이뇨제 등을 복용해야 한다. 특히 노화

현상에 의해 소변 배설이 어려워지면 방광염을 일으키는 일도 있고 이것이 신장에 나쁜 영향을 주어 노화를 촉진한다. 중국은 한방의 임상 실험을 통해 두충이 이뇨제로서 뛰어난 효과가 있다는 것을 확인했다. 두충차를 복용하는 사람들이 유쾌한 하루를 보내는 것은 이 이뇨 작용 때문이다. 또한 배출된 소변은 처음에는 암갈색이지만 2~3회부터는 매우 깨끗한 소변이 되며 혈관 구석구석의 어혈이 없어지는 것을 느끼게 된다. 이러한 이뇨 작용과 어혈 제거는 신체의 다른 질병을 부수적으로 치료해 주기도 한다. 중국에서는 이러한 작용을 이용해 고혈압, 동맥경화 환자에게 두충을 집중 투여했는데 그 결과 혈압이 내려갔을 뿐만 아니라 고혈압에 수반되는 현기증과 두통, 불면증 등도 개선 됐다는 논문이 중국 약리원에 보고되어 있다. 또한 두충이 지닌 어혈(瘀血: 몸에 피가 제대로 돌지 못해 한곳에 맺혀 있는 증세 또는 그 피 제거 효능은 요통 치료에도 도움이 된다. 이는 요통의 원인에 척수 동맥의 어혈에 의한 게 가장 많기 때문이다. 울혈은 혈액 속의 노폐물에 의해 혈전(血栓: 혈액 덩어리)과 콜레스테롤이 혈관에 침착하는 것에서 생긴다. 두충에는 정맥 혈관을 확장하는 작용을 하는 유효 성분이 있고 혈전과 콜레스테롤을 제거 용해하는 작용도 있다. 용해된 혈액은 소변이 되어 배설되므로 이것에 의해 신선한 혈액을 보내는 것이 가능해진다. 중국에서 진나라 때부터 2천여 년에 걸쳐 두충이 불로장수의 약으로서 귀하게 여겨진 것은 이러한 작용이 증시된 때문이다 (Hu, S. Y., 1978).

## 라. 두층의 당뇨 조절 작용

당뇨병은 높은 발병율과 이에 따른 심각한 만성 합병증을 유발함으로써 많은 관심의 대상이 되고 있다. 당뇨병은 병인성에 따라 5가지 유형으로 구분되나 (National diabetes group, 1979), 임상적으로는 인슐린 의존형(또는 제 1형)과 인슐린 비의존형(또는 제 2형)당뇨병으로 크게 분류하고 있다. 인슐린 의존성 당뇨병을 림프구가 췌장 소도내에 침윤됨으로써 인슐린 분비세포인  $\beta$ -cell이 파괴되어 유발되는 일종의 자가면역질환이며, 연령에 관계없이 발병한다. 따라서 인슐린 의존성 당뇨병에서는 혈중 인슐린의 양이 현저히 감소되며 인슐린 분비 부족에 따른 지방 분해 산물인 케톤체의 체내 과다 축적으로 생기는 당뇨병성케톤산증이 일어나는 것으로 보고되어 있다. 이러한 인슐린 의존형 당뇨병에서 나타나는 이차적인 증상을 억제하기 위해서 적절한 인슐린의 투여가 필수적이며 췌장 소도염 예방목적으로 nicotinamide 등이 사용되고 있다. 뿐만 아니라 인슐린 의존형 당뇨병이 이미 발병한 상태에서는 그 진행을 늦추기 위하여 cyclosporin A, azathioprine 등이 사용되고 있다.

이에 비해 인슐린 비의존성 당뇨병은  $\beta$ -cell에서 인슐린은 분비되나 말초표적장기에서의 인슐린에 대한 저항성 증가로 인슐린이 작용을 나타내지 못하는 것을 의미한다. 따라서 케톤산증, 자가항체 등을 관찰할 수 없으며 사람에서는 주로 40세 이후에 발생하며 대체로 비만증을 동반한다. 인슐린 비의존성 당뇨병에서는 식이요법과 운동요법을 병행하며 이러한 방법으로 치료되지 않을 경우 경구용 혈당강하제를 사용

하기도 한다. 이러한 경구용혈당강하제로서는 일반적으로 비만인 환자에게 적용되는 metformin과 같은 biguanide 계통의 약물과 비만하지 않은 환자에게 적용되는 sulfonylurea 계통의 약물이 주로 사용되고 있으나 이들 약물은 심한 유산 혈증과 저혈당의 부작용을 동반한다.

이러한 부작용을 제거하기 위해 최근에 개발된 혈당강하제로서 acarbose와 같은  $\alpha$ -glucosidase 억제제가 사용되고 있다. 이 약물은 소장에서  $\alpha$ -glucosidase의 기능을 억제하여 포도당의 흡수를 지연시켜 당뇨병 환자에게 문제되는 식후 고혈당과 고인슐린 혈증을 개선하면서 동시에 저혈당을 유발하지 않는 장점을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다.

그러나 인슐린 비의존형 당뇨병의 주된 문제인 인슐린 저항성을 개선시켜주는 약품은 현재까지 개발되지 못한 실정이다. 최근에 이러한 당뇨병의 치료제를 전통약물 또는 민간 요법으로 사용되는 식물로부터 찾으려는 시도가 이루어지고 있다.

홍(1987)등의 연구에서는 두충 수피, 가지, 잎 등의 메탄올 추출액을 이용하여 Alloxan으로 유도된 당뇨쥐와 STZ으로 유도된 당뇨쥐를 대상으로 항당뇨 효과를 실험하였다. Alloxan은 langerhans섬의  $\beta$ 세포 파괴에 의한 insulin 분비 부족에 기인하는 원인으로 insulin 의존성 당뇨병(I형)을 유발시킨다. 또한 streptozotocin도 거의 마찬가지로  $\beta$ 세포를 파괴하여 당뇨,고혈당, 체중감소 및 혈중 인슐린치의 감소를 발현시키는 약물로 알려져 있다.

두충 추출액을 당뇨쥐에게 투여한 결과 두충나무의 수피와 엽은 alloxan에 의해 유발된 흰쥐 당뇨병 모델에 대해 혈당상승억제효과를 나타내었으며 대조군에 비하여 현저한 체중증가가 보였으며 두충나무의 수피와 엽은 streptozotocin에 의해 유발된 흰쥐 당뇨쥐 모델에 대해서도 유사한 혈당상승억제 효과를 나타내었다. 또한 두충 나무의 엽은 streptozotocin에 의해 낮아진 혈중 인슐린 함량에 있어서 대조군에 비해 유의성 있는 혈당상승 억제효과를 나타내었다. 이렇듯 두충나무의 수피 및 잎에서는 항당뇨활성을 가지는 것으로 사료된다(Hong N. D. 1987, Hwang W. K., 1996).

#### 마. 두충의 암치료 효과

암은 바이러스에 의한 악성 종양으로 조직을 파괴하고 출혈을 초래하며 인근 조직으로 번져 전신의 영양 장애를 일으킨다. 암의 정체를 밝혀 내기 위한 기초 연구진은 마이크로 일렉트로닉스와 유전자 공학을 토대로 분자생물학의 영역에서 다양한 암 유전자를 발견해 왔다. 인간의 몸은 약 100조 개의 세포로 구성되어 있으며 한 세포당 DNA 사슬을 펼치면 1.8m나 되는데 두세 개의 구성분자(유전 암호)만 대치되어도 암이 되는 경우가 있다는 연구 보고도 있다. 미국 다나하버 암연구소의 쿠퍼 박사에게 의하면 발암에는 적어도 두 개의 암유전자가 관여한다고 하는데 특히 이 유전자는 정상인의 몸 속에서 여러 기능을 하지만 암으로의 증식·이전에 관해서는 어째서 주위의 정상 조직이 침식되는가 하는 이유는 아직 해명되지 않고 있다. 암치료제로서 이

를 높은 인터페론은 신장, 뇌, 만성 임파성 백혈병 등에 10~40% 유효하다는 평가가 나와 있다. 그러나 한방을 이용한 암치료는 아직까지 획기적인 연구 결과는 나와 있지 않다. 건강식품과 한방약 광고에 <기적적인 암치료제>라는 선전 문구도 있으나 정확한 임상 실험을 거친 자료는 없다. 그러나 두충과 같은 한방 약재를 이용하여 암치료에 기여하는 길은 있다(Sasaki, Y. 1996).

하나는 암을 비롯한 성인병에 걸리지 않는 건강 체질을 위해 상용하는 것이며 또 하나는 병후의 관리를 위해서도 응용할 수 있다. 일반적으로 부작용이 없는 한방약과 건강 차는 금방 효력이 나타나지는 않는다. 2개월, 3개월 때로는 1년, 2년 동안 복용을 습관화 했을 때 서서히 세포 내의 유전인자의 성질을 변화시키는 효능을 기대할 수 있는 것이다. 화학물질로 만들어진 서양 약학과 달리 한방에서 상품(上品)으로 분류된 약초는 체질 개선 효과가 큰데 체질 개선이란 몸의 허약한 부분을 근본적으로 바꾸어 가는 것을 의미하며 그렇기 때문에 시간이 많이 걸린다. 한방으로 불치병, 난치병을 고쳤다는 말은 바로 한방약의 체질 개선 효과 때문이다. 즉 한방약은 부분적인 치료뿐만 아니라 몸 전체의 생리작용을 정상으로 유도하며 이에 따라 불치병도 치유될 수 있는 것이다.

재생불량성빈혈, 백혈병 또는 각종 암 등 다양한 질환에서 초래되는 백혈구 감소증이나 혈소판 감소증은 이들 질환의 중요한 합병증이며 직접 사망의 원인이 되고 있다 최근에 유전자 조작으로 합성된 erythropoietin과 여러 가지 합성 성장촉진물질들

을 신성 빈혈이나, 여러 질환과 관련된 백혈구 감소증 환자에게 투여하고 있으나 아직도 혈소판 생성을 촉진시키는 약제는 없는 실정이다. 최근 약제 개발에 대한 연구가 유전자 조작을 이용한 합성에서 생약제의 추출물로부터 신약의 개발에 이르기까지 다양하게 진행되어 왔는데, 두충을 이용한 조혈촉진작용에 관한 실험적 연구에서는 606마리의 흰쥐(Sprague-Dawley, 웅성, 200g)를 실험군, 대조군, 정상대조군으로 나누어 CTX(150mg/kg)를 실험군과 대조군의 복강내로 투여하여 골수부전을 유도한 후 24시간 후부터 생약제의 추출물(600mg/kg)을 실험군에게 4일간 구강투여하여 조혈 촉진효과를 말초혈액검사 및 골수검사를 통하여 비교 분석하였다. 그 결과 두충이 한 종류 이상의 조혈세포 계열에 촉진효과를 나타내었다. ( $P < 0.05$ )이며 적혈구계와 백혈구계에 촉진효과를 보여 조혈세포에 대하여 증식 및 분화를 촉진시키는 것으로 사료되었다(Oh, D. J., 1996).

#### 바. 스트레스 해소 작용

우리들의 생활 주변은 스트레스 발생 요인으로 가득 차 있다. 시간에 맞춰 출근하기 위한 분주한 아침, 자동차, 오토바이의 소음, 상사나 동료들과의 묘한 인간관계, 가정내에서의 부부관계, 자녀들의 교육·진학 문제 등 실로 우리는 스트레스의 바다에 떠 있는 작은 섬이다. 그러나 현대인이 스트레스에서 벗어나는 것은 불가능에 가깝다. 차라리 스트레스의 원인이 되는 모든 상황과 정면으로 부딪치는 것이 마음 편



하다.

그러나 스트레스가 누적되면 몸 여기저기에 악영향을 일으키게 된다. 특히 많이 발생하는 병은 위·십이지장궤양이다. 이것은 쥐와 토끼, 개를 이용한 실험에서도 확인된다. 주기적으로 전류를 흐르게 하거나 전등을 켜다 껐다 하거나, 물 속에서 사육하거나, 소음을 내는 다양한 방법으로 실험을 했는데 위에 궤양을 일으키는 비율이 높았다. 이것은 신경의 자극이 위를 수축시켜 점액 분비를 불균형하게 만들기 때문이다. 인간은 모든 병에 대해서 조금씩은 저항 능력을 갖고 있다. 스트레스에 대해서도 마찬가지인데 급격한 쇼크에 땀을 내는 것은 그 대응 가운데 하나로 내부에서는 부신피질 호르몬이 대량으로 분비되어 그것이 위액 분비를 많게 하기 때문인데 그 때문에 위벽이 짓무르게 된다. 위는 언제나 염분과 펩신의 분비를 균형 있게 조정하는데 스트레스에 의해 부신피질 호르몬이 분비되면 이 균형이 깨진다. 그런데 두충에는 스트레스에 길항(桔抗)하는 성분이 들어 있다. 피노레지놀 다이글루코사이드(pinoresinol diglucoside)가 혈관을 급속히 확장·진정시키는 한편, 진통·진정 효과를 지닌 유효 성분(알칼로이드 등)이 작용하므로 기분이 침착해진다. 그리고 굿타펠카(gutta-percha)라는 고무 상태의 물질이 위벽을 보호하고 비타민C, 타닌이 위액의 과다한 분비를 억제한다. 이러한 종합적인 억제력은 다른 약초에서는 볼 수 없는 효능이다. 부언하면 많은 사람들이 스트레스 해소를 위해 술을 찾는 경우가 허다한데 술은 위벽이 짓물렀을 때 마시면 알코올의 자극으로 짓무름이 한층 심해지며 기분이 가라

있었을 때는 무의식중에 술에 취하게 된다.

그러나 두충차에는 알콜을 억제하는 유효 성분과 이노작용이 있으므로 들 다 마시면 여유 있게 취기를 즐길 수 있다. 또 술 마신 뒤에 머리가 아프거나 불쾌한 느낌이 들지도 않는다. 또한 스트레스를 풀기 위해 과식하는 경우도 있고 다른 사람에게 언성을 높이기도 된다. 그러나 몸이 평상을 벗어나는 것은 좋지 못하며 무엇보다도 중요한 것은 스트레스를 견뎌낼 수 있는 튼튼한 체력과 포용력 있는 마음가짐이다. 그리고 회사에서의 스트레스를 가정으로, 또 가정에서의 스트레스를 회사로 연장시키지 않는 것도 스트레스를 극소화하는 방법이다.

#### 사. 기력·집중력의 지속

이 세상에 살고 있는 개개인을 살펴보면 능력 있는 사람, 혹은 무능력한 사람 등으로 타의에 의해 평가되는 경우가 많다. 그러나 이러한 능력의 차이는 무엇보다도 집중력 지속도의 차이에 있다고 한다. 오랜 경험을 갖고 있는 노련한 교사가 아이들 이 공부에 임하는 태도를 보고 한눈에 그 아이의 능력·소질을 파악해 내는 것도 이 집중력을 기준으로 하는 것이다. 물론 집중력 지속이 단순 작업의 반복과는 다르다. 단순한 끈기가 있다는 의미가 아니라 사고, 창조성을 발휘하면서 장시간 집중력을 지속시켜 가는 것을 말한다. 수재라 할 수 있는 아이는 예외 없이 이 능력이 뛰어나며 또 대부분의 지능 테스트는 지식과 집중력을 시험하는 패턴의 조합에 의해 만들어진

것이다. 집중력의 지속이 능력을 발휘하는 관건이 된다는 것은 모든 분야에 적용된다. 스포츠의 세계도 마찬가지로 야구의 투수가 타자에게 주는 위압감은 기력에 의해서지만 목표한 대로 공을 던지는 것은 대단한 집중력을 필요로 한다. 야구뿐만 아니라 어떠한 운동이나 기력, 집중력은 심신의 단련에 빼놓을 수 없는 요소다. 그러나 인간이 문명생활에 익숙해지면 아무래도 강한 정신력에 느슨함이 생기는 것 같다. 두충은 예로부터 기(氣)의 약이라 했다, 이것은 두충에 이뇨작용을 촉진시키는 성분이 있고 알칼로이드의 일종이 심장에 가벼운 흥분을 주며 이 밖에 관상동맥·신(腎)동맥을 확장시키는 작용이 서로 종합되어 신장·심장의 기능을 강하게 함으로써 기력이 충실해지기 때문일 것이다. 물론 이런 상승작용이 사람의 집중력을 증가시킨다는 임상 실험자료는 없지만, 두충에는 척수정맥의 울혈을 없애는 작용이 있고 그것이 오장의 기능을 활발하게 해 주는 것은 사실이다. 이 정맥의 울혈을 제거하는 작용에 관해서는 현대 의학에서도 그 효과를 인정하고있다. 또한 한방에서는 수분을 필요 이상으로 많이 섭취해 그것이 습관이 되어 비만으로 이어지는 것을 몹시 경계한다. 따라서 수분 과잉으로 비만한 체질이 되면 만병을 초래한다는 말도 있다. 이러한 비만 체질의 사람은 일반적으로 집중력의 지속이 잘 안 되며 특히 당뇨병 일보 직전의 사람과 긴장의 피로가 심한 사람은 기력, 집중력 모두 위축된다. 어린아이에게는 학력 저하를 초래하며 어른인 경우에는 무기력이 무능력으로 평가돼 직장에서의 출세에 방해가 되거나 경영 파탄으로 연결되는 일도 있을 수 있다. 기력 충실은 육체적인 건강이 기

초가 된다. 그런 의미에서 두충차는 체내의 노폐물의 배설 속도를 빠르게 하는 효과가 있으므로 늘 몸을 상쾌하게 만들어 준다 그것이 운동, 식생활과 어우러져 건강을 유지하는 데도 큰 도움이 되는 것은 당연하다(Chien, T. H., 1957).

#### 아. 요통과 디스크의 치료

나이가 들면 들수록 골격이 연약해지고 근육에 무력감이 나타나는 것은 자연적인 현상이며 이로 인해 전신을 지탱하고 있는 허리뼈에 이상이 생겨서 골격과 골격을 이어주는 물렁뼈가 내려앉기도 하고 밖으로 튀어나오기도 한다. 이때 환자는 통증을 참을 수 없게 되고 잘 걸을 수도 없다. 이러한 증상이 계속되면 허리가 굽어지고 마침내는 전혀 활동을 할 수 없는 사람이 되고 만다. 그런가 하면 허리 운동을 많이 했던 운동선수나 노동을 심하게 했던 사람들도 디스크로 시달리는 경우가 많다. 또한 콩팥(신장)의 기능이 떨어지거나 지나친 성생활로 허리가 아프게 된 사람을 많이 보게 된다. 한방에서는 요통의 원인을 풍, 한, 습, 담, 신허, 식적, 섬좌, 어혈, 습열 등 9종으로 분류해 왔다. 여기서 풍, 한, 습이 원인이 된다는 것은 이들이 방광에 침입하여 혈액이 정상적으로 순환치 못하므로 통증이 생긴다는 것을 의미한다. 그리고 어혈은 교통사고나 높은 곳에서 추락하는 등의 급격한 외부 충격으로 허리 부분에 울혈이 되어 혈액 순환 장애를 일으킨 것을 말하며, 담이나 식적은 음식물 장애로 인하여 소화 기능이 쇠약해지고 또 오랜 지병으로 전신 기능이 쇠약해서 일어나는 것을 이르는

말이다. 이렇게 보면 요통의 원인은 참으로 다양하고 복잡하지만 이 모든 원인을 가릴 것 없이 요통과 디스크에 가장 효과적인 치료약은 바로 두충 나무의 껍질이다. 두충 나무는 본래 단풍이 들지 않고 잎이 떨어지며 나무껍질이나 잎을 찢어보면 여기에는 수많은 실이 연결되어 있어서 쉽게 끊어지거나 잘라지지 않는다. 이것은 약으로 쓸 때에는 물론 볶아서 껍질을 제거하고 사용하지만 이러한 상호 견인작용은 결국 인체 내에서 골격과 근육의 이음새를 강하게 해 주는 것으로 해석된다. 그러나 아무리 좋은 명약이라 할지라도 하루나 이틀 먹는다고 해서 특효를 보는 것은 아니며 몇 주에서 몇 개월 또는 그 이상을 복용해야 할 때도 있다. 그렇게 하면 허리뼈와 근육의 통증이 없어지고 근육의 수축작용이 활발해지며 골질에 구멍이 많이 생기는 증상을 막아준다. 두충의 특징은 다른 장기에 피해를 주지 않고 근육과 골격에 힘을 얻게 하는데 있으며 이 작용의 근간은 간 기능을 상승시켜 주고 신장의 기능을 높여 결과적으로 선천적인 기운을 증강시키는 것이다. 또한 관절염, 퇴행성 관절염, 류머티스성 관절염 등에도 유효하여 근육 경련, 근육 무력증과 이완 증상을 개선시키는데 있어 두충을 따를 만한 약이 없다고 해도 결코 지나친 말은 아닐 것이다(Yu, C., 1986).

#### 자. 비만 방지

단 것을 너무 많이 먹는 것은 비만의 원인이 될 뿐만 아니라 콜레스테롤과 중성지방의 양을 증대시켜 위장병과 당뇨병의 원인이 되게 한다. 또한 현대생활은 일반적으로

칼로리의 소모를 줄어둘게 한다. 따라서 식생활의 향상이 칼로리의 섭취를 증대시키고 그 결과 비만으로 고민하는 사람도 계속 늘고 있다. 현재 미국에서는 다이어트 식품 산업이 대단히 큰 시장을 형성하고 있다. 사람으로부터 애완 동물에 이르기까지 그 시장 규모는 10조원 가까이 된다고 한다. 그러나 그 대부분이 저 칼로리 식품이어서 미국인들 사이에서는 식생활의 부족함을 호소하기에 이르렀다. 그리하여 미국에서는 새로운 다이어트 식품에 관심이 집중되었고 두충차를 비롯한 한방 건강차가 새로운 인기를 모으고 있다. 특히 두충차는 홍차와도 향기가 비슷하여 큰 거부감 없이 받아들여지고 있다. 한때 미국의 의학계에서 비만이 수명을 단축시킨다는 학설을 내놓은 바도 있으나 현재 그런 생각을 하는 학자는 매우 적다. 확실히 한국인에게도 비만형은 있고 비만형에 장수자가 적다는 것은 부정할 수 없다. 그러나 건강유지라는 점에서는 표준 체중보다 4kg정도 초과되어도 걱정할 필요가 없다. 그러나 미국인은 한국인과 달리 초 비만형이 많고 일단 뚱뚱해지면 쉽게 살이 빠지지도 않는 체질이다. 식생활에 있어서도 콜레스테롤 투성이인 육식 중심이며 1회 식사량도 우리와 비교할 수 없이 많다. 그래서 두충 같은 한방약에 다른 효능이 많은데도 오로지 비만방지의 묘약으로만 평가되고 있는 실정이다. 그것은 두충이 갖고 있는 대사촉진 성분과 이노 효과 성분, 타닌, 비타민C, 칼슘 등의 상승작용에 의해 인체 기능의 균형을 유지하기 때문이다. 중국인들이 기름진 음식을 많이 먹으면서도 비만인 사람이 적은 이유는 바로 식후에 두충차를 복용하는 습관에 있다(Nakasa, T., 1995).

## 차. 숙취 방지

술을 많이 마신 다음날 아침이면 머리가 아프거나, 속이 쓰리거나, 입 안에서 이상한 냄새가 나거나 하여 하루의 출발이 불쾌했던 경험을 남자라면 몇 번 정도는 갖고 있을 것이다. 그러나 두충차를 마신 사람들은 예외다. 두충차를 마신 사람들은 취기 방지약이 아닌가 하고 여기게 된다. 술을 3홉 정도 마셔도 알콜 검사에 걸리지 않았다는 이야기도 있을 정도다. 이런 것은 두충의 효능을 약간 과장한 얘기라고는 생각되나 필자도 숙취 방지에 안성맞춤인 차라는 데는 동감한다. 두충뿐만 아니라 커피, 홍차 등에도 취기를 깨게 하는 성분이 들어있으나 이것은 주로 카페인에 의한 각성작용 때문이다. 그래서 완전히 취해 버리면 아무리 커피를 마셔도 효과가 없다. 오히려 카페인을 많이 섭취하면 위벽을 상하게 하여 기분이 나빠진다. 또 짙은 차와 커피를 몇 잔씩 무작정 들이킬 수도 없는 일이다. 그러나 두충차의 숙취 방지 원리는 커피와는 전혀 다르다. 두충의 숙취 방지 원리는 이노작용과 알칼로이드에 의한 신경의 진정 작용에 의한 것이다. 여기에 비타민 C가 더해져 몸의 상태를 가뿐하게 만든다. 게다가 두충에는 중독성이 있는 카페인이 전혀 들어 있지 않다. 다음날 아침부터 중요한 회의가 있는데 밤늦게까지 손님을 접대하지 않으면 안 되는 상황은 회사원이거나 비즈니스맨에게 여러 번 찾아온다. 그럴 때는 술과 번갈아 두충차를 마시도록 하면 그다지 취하지 않으며 술좌석에서 중요한 상담이 있을 때도 술에 취해 실수하는 것을 방지할 수 있다. 많은 사람들의 체험담을 종합하면 50ml 물에 2g짜리 한 봉을

넣어 잘 달인 두충차를 20분에 걸쳐 모두 마시는 것이 일반적인 숙취 치료법이다. 물론 본질적으로 알코올을 받아들이지 못하는 체질인 사람도 있고 각자 몸 상대도 다르므로 모두 것처럼 특효가 있는 것은 아닌지도 모른다. 그러나 필자의 오랜 경험으로 보면 두충차의 음용은 숙취 방지에 발군의 효과가 있다고 확신한다. 또한 두충차의 좋은 점은 숙취로 위가 아무것도 받아들일 수 없을때조차도 얼마든지 마실 수 있다는 것이다. 커피처럼 과음으로 위에 부담이 가는 느낌도 전혀 없다. 두충차를 마시면 아세트알데히드가 오줌과 함께 쉽게 배설된다. 처음에는 알코올로 타해진 오줌도 점차 깨끗해져 숙취의 나쁜 기분도 없어진다. 숙취가 되는 이유는 알코올이 혈액 속에 체류하는 과정에서 아세트알데히드로 바뀌기 때문이다. 이 아세트알데히드는 또한 두통, 현기증, 속의 거북함, 오한을 일으킨다. 종종 썩은 감 냄새라고 말하는데 썩은 감같은 냄새가 바로 아세트알데히드의 냄새다. 알코올이 혈액량의 2% 이상이 되면 사람에게 따라서는 급성 알콜 중독이 되는 경우도 있고 좀더 농도가 진해지면 죽는 경우도 있다. 또 소량이라도 오랜 기간 술을 습관적으로 마시면 알콜 중독이 되어 술 없이는 하루도 지낼 수 없는 폐인이 돼 버린다. 알콜의 잔류분은 통상 성인인 경우 30시간을 전후하여 모두 몸 밖으로 배출된다, 그러므로 하루 반의 금주는 알콜 중독 방지에 효과가 있다. 회사원들 중에는 의도적으로 일 주일에 하루 이틀 정도는 술을 안 마시는 사람이 많은데 이는 건강을 위해 대단히 좋은 방법이다. 지금까지 서술한 바와 같이 두충차에는 강한 이뇨작용이 있으므로 늘 술을 대하는 사람에게 빼놓을 수 없는 건강



차라 할 수 있다. 건강을 위하여, 활기찬 하루를 보내기 위하여 일상생활 속에서 두충을 가까이 하면 여러 모로 좋다(Chien, T. H., 1957).

#### 카. 간장병 치료

두충이 숙취 예방에 뛰어난 효과가 있다는 것은 이미 살펴본 바와 같다. 당연한 이야기이지만 두충은 간장병에 훌륭한 효과를 발휘한다. 일본의 연구진이 동물실험을 통해서도 이러한 사실을 실증한 바 있다. 실험은 GOT, GPT치를 정상치 이상으로 높여 놓은 쥐를 두 집단으로 나누어 한쪽에는 두충의 분말을 음료수에 타서 먹이고 또 다른 한쪽에는 두충을 투여하지 않았다. 26주 후에 두 집단의 혈청 가운데 GOT, GPT치를 측정해 보니, 두충을 투여한 집단의 측정치는 현저하게 낮아졌다. 이 실험에서 말하는 GOT와 GPT는 간장에 있는 효소의 명칭이다. 이 효소들은 간장에 장애를 일으킬 때 혈액으로 흘러나온다. 그러므로 혈중의 GOT, GPT치를 측정해 보면 간장의 이상 유무를 알 수 있게 된다. 이 실험을 통해서 두충이 간장 기능의 향상에 뚜렷한 효과를 발휘한다는 것을 알 수 있다. 본초강목(本草綱目)에 옛날에는 두충이 신(腎)을 윤택하게 하는 작용밖에 알려져 있지 않았으나 그 외에 간(肝)에도 작용하여 간을 윤택하게 하고 강하게 하는 작용도 있음이 밝혀졌다는 구절이 나오는데 현대 과학의 힘으로 입증된 셈이다(Hu, S. Y, 1978, Chien, T. H., 1957).

국내에서의 두충의 생체조절 작용 연구는 실험동물을 이용한 효과 확인에만 머물

려서, 두층 수피에 의한 토끼 혈압 강하효과, 이뇨작용, 담즙산 배설 촉진작용, 항피로작용 및 진통 및 소염효과가 보고되었다. 또한 두층 수피 methanol 추출물을 1g/kg 씩 14일간 alloxan으로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에게 14일간 투여하였을 때 혈당치와 insulin치의 감소가 보고되었다.

## 제 2절 연구의 필요성

### 1. 기술적 측면

식품에 의한 만성 퇴행성 질환의 예방과 치료가 의약품에 의한 치료보다 부작용 최소화와 경제적인 측면에서 더 효율적이라는 것이 밝혀짐에 따라 기능성 식품 연구가 약 10여년 전부터 미국과 일본 등 선진국에서는 국책사업으로 활발히 진행되어 오고 있다. 그러나 지적 소유권 확대로 선진국들은 기능성 소재 개발의 기술 이전을 회피하므로 국내 자체 개발이 필요하다. 국내에서도 최근 기능성 소재의 수요가 급증함에 따라 기능성 소재에 대하여 많은 연구를 하고 있다. 그러나 그 작용 기작을 과학적으로 구명하고 활성 물질을 밝힌 후 식품에 적용하기 보다는 식품의 조추출물이 시험관내에서 효과를 보이면 바로 상품화하거나, 한국 전래의 동의보감이나 외국의 연구에서 효과가 알려진 농산물에 대한 실험 동물을 이용한 효능 확인 정도만 하고 있

는 실정이다. 현재 국내에서의 건강보조식품의 제조가 의약품 만큼 철저한 연구가 뒷받침되지 않아도 허가를 받을 수 있다고 하여 식품의 기능성 연구를 시험관 내에만 국한하는 것은 인체에서의 효과가 의심스러울 뿐만 아니라 국민 건강상 대단히 위험하며, 미국과 일본 등에서의 기능성 식품 허가는 활성 성분과 인체내에서의 효과의 구명을 요구하기 때문에 국외 수출까지 고려한다면 연구의 수준을 높힐 필요가 있다. 또한 생체 기능을 조절하는 주요한 성분이 구명되지 않은 상태에서는 식품소재화할 때 규격화 및 품질 관리의 지표 물질을 설정할 수 없어서 상업화에 문제가 따른다.

지난 10여년간 국내에서 연구되고 개발된 당뇨조절 소재는 식이섬유와 올리고당이 었다. 그러나 식이섬유 및 올리고당은 정상 효과, 혈중 콜레스테롤 저하 효과 등과 더불어 포괄적인 개념의 당뇨조절 소재이었다. 의학 분야에서는 지난 수십년에 걸친 연구로부터 당뇨병의 발병 및 그 합병증 진전 기작이 구명되고 있다. 이러한 기작에 의하여 당뇨조절 소재를 개발하면 효율적 당뇨병 관리가 이루어질 수 있으며 그 원료 농산물은 막대한 부가가치를 창출할 수 있을 것이다.

## 2. 경제 산업적 측면

두충 수피는 소비자가 구매할 경우에는 50,000원/kg (20,000원/400g, 1근)의 가격이지만, 재배농가는 30,000원/kg의 가격으로 유통업자에 판매하고 있어서 생산 원가

를 제외하고 나면 재배 농가에게 돌아가는 이익은 현재로서는 20,000원/kg정도이다. 따라서 수피를 재배 농가로부터 직접 구매하여 고부가가치 제품화하면 현재보다 더 많은 이익이 재배 농가에게 돌아갈 수 있다.

두충나무에서 농산물로서 매년 부가적으로 수확할 수 있는 잎, 가지, 열매의 활용도를 개발하면 두충의 부가가치를 높힐 수 있다. 현재 재배 농가는 잎을 20,000원/kg 정도에 판매하며, 가지와 열매는 현재 활용도가 없기 때문에 가격이 설정되어 있지 않다. 잎은 '97년에 300 ton 가량 생산되어 일부는 차로 가공되었으며, 나머지는 사료로 이용되기도 하고 폐기 처분되었다. 가지와 열매의 이용은 아직까지 개발된 바 없다. 따라서 두충 재배 농가의 생산성을 향상시키기 위하여는 생산량이 수요량보다 많은 두충 수피와 활용도가 개발되어 있지 않은 잎, 가지, 열매 등의 이용 기술 개발이 필요하다.

시장 규모가 증가하고 있는 기능성 식품 산업은 특정한 생체조절기능이 우수한 원료 농산물의 발굴을 필요로 한다. '97년 12월 IMF 체결로 환율이 급등함으로써 수출에 의한 이익이 극대화된 이 때에 국내산 원료를 사용한 수출 상품의 개발이 절실하다. 농산물의 단순 처리가공보다는 생체조절기능이 우수한 원료 농산물을 기능 소재화함으로써 그 부가가치는 몇 배 상승한다. 특정한 생체조절기능이 우수한 농산물을 발굴하여 기능 소재화한다면 국내 소비는 물론 수출 상품이 될 수 있을 것이다.

WTO 체제와 UR 타결 이후 생산비와 국제가격을 비교한 가격 경쟁력에서 쌀, 콩,

사과, 배, 감귤, 고추 등 주요 작물의 국제 경쟁력은 낮아져서 이들 작물의 생산량은 감소하고 재배 면적이 감소하는 추세이며 이에 따라 농지전용, 한계농지 등이 발생하고 있다. 이에 비하여 경쟁력이 있는 특수작물의 재배는 증가하고 있다. 수입이 금지되어 재배가 육성된 두충 생산 농가를 계속 보호하기 위하여는 두충의 가격 폭락 사태가 일어나기 전에 이용성 증대 방안을 강구할 필요가 있다. 아울러 고부가가치 소재로 활용 가능한 지역적 특산 농산물의 재배에 집중 투자함으로써 지역 균형 발전의 기반을 제공할 수 있다. 계속되는 이농 현상의 증대와 도시로의 집중 유입은 인구문제, 환경오염 문제 등을 야기하여 우리나라의 큰 사회 문제인 바, 고부가가치성 농산물의 재배에 의한 농가소득 증대는 도농간 소득 격차를 최소화하여 이농 현상을 감소시킬 수 있다.

당뇨병 치료제의 세계 시장 규모는 1998년 현재 300억불, 국내 시장 규모는 50억불로 추산되는데 현재 사용되고 있는 의약품을 대체할 저독성 식품소재의 개발이 필요하다. 당뇨병 환자는 국내 인구의 7%, 미국 인구의 12%를 차지하며, '97년 사망 원인 통계에 의하면 당뇨병으로 인한 사망자가 인구 10만명당 23명으로 '87년과 비교할 때 150% 증가하였으며, 식생활의 서구화와 평균 수명의 연장 등으로 그 증가율은 급증하고 있다. 당뇨병은 일단 발병하면 완치가 어렵고 평생 동안 관리하여야 하는 질환으로서 그 어떤 질환보다도 의약품보다는 식품에 의한 조절이 바람직하여 국민 건강을 위하여도 당뇨조절 식품소재의 개발이 필요하다.

당뇨조절효과의 극대화를 위하여는 하나의 조절 mechanism을 이용하는 것보다는 여러 mechanism을 이용하는 것이 더 효율적인데, 여러 mechanism을 이용한 당뇨소재 개발이 시도된 바 없다. 기능성 식품소재 제조 공정상의 품질 관리 지표 물질의 설정을 위하여는 원재료로부터 활성 성분이 구명되어야 하는데, 현재 두층의 당뇨조절 성분에 대하여 연구된 바가 없다.

두층은 국내에서 수급조절대상 품목으로서 국내 농가에서의 재배가 보호 받고 있어서, 그 생산량이 매년 증가하고 있다. 증가되는 생산량을 적절히 이용할 기술이 개발되지 않는다면 국내 가격이 폭락할 우려가 있다.

본 과제를 통하여 얻어진 결과를 현장에 적용하게 된다면 현재 껍질의 생산만을 위하여 재배되는 두층의 부가산물인 잎, 가지, 열매 등을 껍질과 함께 이용하게 되어서 두층의 부가가치를 향상시킬 수 있다. 당뇨병을 예방하거나 조절할 수 있는 소재로서 작용 mechanism과 활성성분이 확실히 구명된 것은 국외로의 수출 경쟁력도 우세할 전망이다. 국내산 농산물의 가공 이용 기술은 국내 자체의 기술이 개발되어야 국내 농가에 적용이 가능하리라고 판단된다.

### 3. 사회 문화적 측면

농촌 경제 구조가 갈수록 고도화, 전문화되어감에 따라 농산물의 고부가가치화를

추구하고 있다. 이러한 농촌 경제 발전과 더불어 농산물의 가공도 단순한 수확, 건조 보다는 그 농산물의 기능적 특성을 최대한 이용한 기술이 개발되어야 한다. 특히 최근에는 전문적으로 농업을 연구한 사람들의 귀농으로 인해 지역 특성을 살린 특화작물이나 새로운 영농법이 등장하여 농촌 경제에 활력을 불어 넣고 있다. 따라서 두층의 고부가가치화를 위한 새로운 이용 기술이 개발된다면 이미 두층을 재배하고 있는 지역을 중심으로 특화작목화하여 그 지역 농촌 경제의 발전을 도모할 수 있으며, 두층은 국내에서의 재배가 용이하므로 새로운 재배지의 형성도 가능하리라고 판단된다.

계속되는 이농 현상의 증대와 도시로의 집중 유입은 인구문제, 환경오염 문제 등을 야기하여 우리나라의 큰 사회 문제인 바, 고부가가치성 농산물의 재배에 의한 농가소득 증대는 도농간 소득 격차를 최소화하여 이농 현상을 감소시킬 수 있다.

당뇨병 환자는 국내 인구의 7%, 미국 인구의 12%를 차지하며, '97년 사망 원인 통계에 의하면 당뇨병으로 인한 사망자가 인구 10만명당 23명으로 '87년과 비교할 때 150% 증가하였으며, 식생활의 서구화와 평균 수명의 연장 등으로 그 증가율은 급증하고 있다. 당뇨병은 일단 발병하면 완치가 어렵고 평생 동안 관리하여야 하는 질환으로서 그 어떤 질환보다도 의약품보다는 식품에 의한 조절이 바람직하여 국민 건강을 위하여도 당뇨조절 식품소재의 개발이 필요하다.

### 제 3절 연구의 목적과 범위

본 과제에서는 국내에서 재배되는 두충으로부터 혈당강하성분 및 당뇨합병증 억제 성분을 분리하여 그 특성을 구명하며 생체내 효과를 확인함과 동시에, 두충을 이용하여 혈당강하효과와 당뇨합병증 억제 효과를 동시에 나타내는 식품소재 생산의 산업적 가공 공정을 확립함으로써, 두충을 활용한 당뇨조절 식품소재를 개발하였다.

본 과제는 3개의 세부과제 즉 1. 두충의 당뇨조절 성분 구명, 2. 두충의 생체내 당뇨조절 효과 연구, 3. 두충을 이용한 당뇨조절 소재 생산 가공 공정 연구로 구성하였다. 두충 주재배지의 생산자 단체에 직접 협조를 요청하여 두충의 잎, 가지, 열매, 껍질 등을 확보하였다.

제1 및 제2 세부과제인 두충의 당뇨조절 성분 구명 및 생체내 당뇨조절 효과 연구는 1차년도에는 두충 잎, 가지, 열매, 껍질의 각 부위별 및 혼합물의 혈당강하효과 및 당뇨합병증 억제 효과를 비교 검토한다. 각 부위의 혼합에 의하여 성분의 수가 많아지면 활성 성분의 분리 정제가 더 어려워지므로, 활성 성분 분리는 가장 효과가 높은 부위로 진행한다. 3차년도의 실험동물에의 급여에 의한 장기간의 당뇨조절효과 평가는 제1,2 세부과제의 2차년도까지의 연구 결과를 검토하여 최적 조건으로 추출된 소재를 대상으로 하며 혈당강하효과와 당뇨합병증 억제효과를 동시에 평가하였다.

제3 세부과제인 가공 공정 확립 연구는 제1 세부과제와 제2 세부과제가 진행되어



야 활성 성분 추출 조건 확립 등의 연구가 수행될 수 있었다. 제1 및 제2 세부과제의 2차년도까지의 수행에 의하여 구명된 활성 성분 구명 등의 연구를 토대로 소재 생산의 규격화 및 품질관리에 필요한 지표 물질 설정 및 가공 공정 확립 등의 연구를 수행하였다.

## 제 4절 참 고 문 헌

이창복 : 대한식물도감. p. 424(1982)

Chien, T. H. Pharmacological action of *Eucommia ulmoides*. *Jpn. J. Pharmacol.* 6: 122-137(1957)

Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa and S., Nishibe, S. The constituents of *Eucommia ulmoides* IV. Isolation of a new sesquilignan glycoside and iridoids. *Chem. Pharm. Bull.* 34:4933-4938(1986)

The Diabetes Control and Complication Trial Research Group: The effect of

intensive insulin treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 329:977-986, 1993

Hong N. D., No, Y. S., Kim, J. W., studies on the general Pharmacological activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor J. Pharmacogn.* 18(2):112-117(1987)

Hu, S. Y., A Contribution to our Knowledge of Tu-Chung-*Eucommia ulmoides*. *American J. Chinese Med.* Vol. VII, No. 1, 5-37 (1978)

Hwang W. K., Choi, S. B. and Kim, I. H. Physiological activities of mixed extracts of *Acanthopanax senticosi* radiceis cortex and *Eucommiae* cortex. *Kor J. Pharmacogn.* 27(1) : 65-74(1996)

Kim, H. Y. Hypocholesterolemic and Hypotensive activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Food Industry and Nutrition.* 5(2): 27-28(2000)

Klein, R., Klein, B.E.K., Moss, S.E., Davis, M.D., DeMets, D.L.: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of

diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. Arch. Ophthalmol. 102:520-6, 1984

Klein, R., Klein, B.E.K., Moss, S.E., Davis, M.D., DeMets, D.L.: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is more than 30 years. Arch. Ophthalmol. 102:527-32, 1984

Lorenzi, M., Cagliero E., Toledo, S. Glucose toxicity for human endothelial cells in culture : delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. Diabetes 34: 621-27, 1985

Metori, K., Furutsu, M. and Takahashi. S. the prevention effect of ginseng with Du-Zhung leaf on protein metabolism in aging. *Biol. Pharm. Bull.*, 20:237-242(1997)

Metori, K., Furutsu, M. and Takahashi. S. the prevention effect of ginseng with Du-Zhung leaf on protein metabolism in aging. *Biol. Pharm. Bull.*, 20:237-242(1997)

Naeser, P. Cell replication in retinal vessels of streptozocin diabetic mice.  
*Acta Ophthalmol* 64: 439-440, 1986

Nakamura, T., Nakazawa, Y., Onizuka, s., Satoh, S., Chiba, A., Seikashi, K.,  
Yasugahara, N. and Sasaki, Y. Antimutagenicity of Tochu tea: 1. The  
clastogen-Suppressing effect of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mut. Res.*,  
388:7-20(1997)

Nakasa, T., Yamaguchi, M., Okinaka, O. and Metori, K. Effects of Du-zhung leaf  
extract on plasma and hepatic lipids in rats fed on a high fat plus high  
cholesterol diet. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 69, 1491-1498 (1995)

Oh, D. J., Park, M. H., Park, S. S., Yoon, J. H. and Cho, H. I. *The Korean  
Journal of Hematology*, 31(2) :225 -234 (1996)

Ohkubo, Y., Kishikawa, H., Araki, E., Miyata, T., Isami, S., Motoyoshi, S.,  
Kojima, Y., Furuyoshi, N., Shichiri, M. Intensive insulin therapy prevents the  
progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with

non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study.

Diabetes Res. Clin. Pract. 28(2): 103-17, 1995

Orlidge, A., D'Amore, P.A. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. J. Cell Biol. 105:1455-62, 1987

Sasaki, Y., Satoh, S., Chiba, A., Murakami, M., Sekihashi, K., Tanaka, M., Moribayashi, N., Kudou, C., Hara, Y., Nakazawa, Y., Nakamura, T. and Onizuka, O.: Antimutagenicity of Tochu tea: 2. Suppressing effect of tochu tea. Mut. Res., 371, 203-214(1996)

Stout, R.W. Glucose inhibits replication of cultured human endothelial cells. Diabetologia 23: 436-9, 1982

Toborek, M., Henning, B. Fatty acid-mediated effects on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cells. Am. J. Clin. Nutr. 59: 60-5, 1994

Yu, C., Yang, C. P., Huang, C. J. and Liu, H. J. The diuretic and

carviovascular effects of cortex eucommiae. Bull. Taipei. Med. Coll-Abstr  
chin. Med. 870966 (1986)

## 제 2 장 두충의 당뇨조절 성분 구명

### 제 1절 서론

두충나무로부터 당뇨병을 조절할 수 있는 성분들은 당뇨병 예방 및 치료의 두 가지 방법 즉 혈당강하 및 합병증 억제 측면에서 연구하였다. 두충나무의 각 부위별로 효능을 검색한 후 가장 효능이 우수한 부위로부터 활성 성분을 분리하였으며, 이 성분들의 다른 부위에서의 함량을 구하였다.

우선 당뇨병 예방 및 치료에 있어서 혈당강하의 중요성을 살펴보면, 당뇨병 환자는 미세혈관 합병증 및 심혈관 합병증이 주요 사망 원인이 되며 이는 주로 장기간의 고혈당에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다. 미국의 DCCT (Diabetes Control and Complication Trial) 결과에 의하면 인슐린 의존성 당뇨병 환자에서 집중적인 인슐린 요법에 의한 혈당 조절의 개선에 의해 미세혈관 합병증의 1차 및 2차 예방을 이룰 수 있다고 한다(DCCT). DCCT와 비슷한 controlled study는 아직은 없지만 인슐린 비의존성 당뇨병 환자에서도 고혈당과 만성 합병증과의 연관이 있다는 것을 시사하는 연구 결과는 많이 있다. 엘르 들어 WESDR (Wisconsin Epidemiology Study of Diabetes Retinopathy) 결과에 의하면 당뇨병의 치료와 관계 없이 당화 혈색소 농도와 당뇨병성 망막증의 발생 및 진행이 유의한 상관 관계를 보인다고 하며 (Klein, R., 1984:

Klein, R., 1984) 일본의 Kumamoto study에서도 비슷한 결과를 보고하고 있다 (Ohkubo, Y., 1995). 이러한 결과들에 비추어 볼 때 인슐린 비의존성 당뇨병 환자에서도 만성 합병증을 효율적으로 예방하려면 철저한 혈당 조절이 관건이 됨은 쉽게 짐작할 수 있다. 인슐린의 절대적 결핍에 의하여 발생하는 인슐린 의존성 당뇨병 환자에서는 인슐린의 보충만이 유일한 치료법인데 비해 인슐린 비의존성 당뇨병 환자에서는 다양한 기작을 이용한 혈당강하 소재가 개발된다면 유용할 것이다.

당뇨병의 합병증은 당뇨병 환자의 이환율과 사망률을 결정하는 중요한 요소이다. 특히 급성 대사성 합병증에 비해 미세혈관이나 대혈관 합병증과 같은 만성 합병증이 환자의 예후를 결정하는 중요한 인자로 인정되고 있다. 만성 합병증은 망막병증, 신증, 신경병증을 포함한 미세혈관 합병증과 관상 동맥 질환, 뇌혈관 질환, 말초 혈관 질환을 포함한 대혈관 합병증 및 족부 병변으로 분류되며, 현재 합병증 발생에 관한 여러 가지 가설이 제시되고 있다. 일반적으로 당뇨병성 미세혈관 합병증은 이환 기간이 길어지고 고혈당이 심해짐에 따라 증가한다고 알려져 있고 대혈관 합병증도 당뇨병의 이환 기간에 따라 증가하며 미세혈관 합병증과 연관되어 발생한다는 일부의 보고가 있으나 미세혈관 합병증에 비해 그 경향이 뚜렷하지는 않다. 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 만성 합병증의 유병률은 보고자 및 종족간에 차이가 있으며 관련 인자에 대한 보고도 다양하다. 한국인의 당뇨병은 구미 각국에 비해 그 빈도가 적고 합병증의 발생 양상이 다른 것으로 알려져 유전 및 환경적 요인 등도 영향을 미치는 것으로



로 생각되고 있다. 그러나 국내에서는 당뇨병 환자의 이환 기간 및 연령에 따른 만성 합병증의 유병률 및 관련 인자에 대한 보고가 아직 부족한 실정이다.

당뇨병성 혈관 합병증이 유발하는 부위로는 망막, 신사구체 및 신경 조직의 미세 혈관 (microvascular blood vessel), 하지, 경동맥 및 관상 동맥의 대혈관 (macrovascular blood vessel) 등을 들 수 있다. 이러한 혈관 합병증의 중요한 원인으로서는 고혈당 그 자체를 들 수 있으며 최근 DCCT의 연구 결과로 이와 같은 사실은 더욱 분명해졌다. 고혈당이 어떤 경로를 통해 혈관 합병증을 초래하는지에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다. 고혈당은 혈관내피세포의 손상과 기능에 이상을 초래한다. Lorenzi 등과 Stout 등은 고폍도당 농도 상태에서 혈관 내피세포의 증식이 억제된다는 것을 보고하였으며, Naeser 등도 고폍도당 농도가 망막 모세혈관 내피세포의 증식을 억제한다고 하였다. 이러한 시험관내 실험 결과를 생체내에 적용해 보면 어떠한 원인으로 증식과 이동으로 손상 부위가 회복되나, 당뇨병 상태에서는 혈관 내피세포의 증식 속도 저하로 회복이 어렵다. 이러한 고혈당시 혈관 내피세포의 증식 속도 이상은 세포 증식 cycle의 이상으로 유발된다.

당뇨병성 망막증 및 신증 등과 같은 당뇨병의 미세혈관 합병증은 당뇨병 환자의 사망률 및 이환율을 증가시키며, 미국에서는 이러한 당뇨병의 만성 합병증으로 인한 입원으로 소요되는 경비가 연간 10억불에 이르는 것으로 보고되고 있어 심각한 사회적 문제로 대두되고 있다. 최근 미국에서 시행된 DCCT 연구 결과는 철저한 혈당 조

질이 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 미세혈관 합병증 발생을 뚜렷이 감소시킬 수 있음을 보고함으로써 고혈당이 미세혈관 합병증 발생에 중요한 역할을 함을 증명하였다. 그러나 잘 조절되지 않은 당뇨병을 오랜 기간 가지고 있던 환자에서도 미세혈관 합병증이 전혀 발생하지 않는 경우도 있으며, DCCT 연구결과에서도 나타난 사실이지만 혈당조절을 철저히 하더라도 미세혈관 합병증의 발생을 완전히 예방하지는 못한다는 점을 보아 고혈당 이외에 당뇨병의 다른 대사장애가 미세혈관 합병증의 원인이 될 가능성이 있다.

당뇨병성 미세 혈관 합병증에서 공통적으로 나타나는 전형적인 형태학적 특징은 기저막 (basement membrane)의 비후이다. 기저막 비후는 혈관 및 비혈관 조직에서 모두 나타나며, 유관 (mammary duct), 고환 및 한선 (sweat gland)에서도 관찰된다. 대부분의 조직에서는 기저막은 간질 (interstitial space)과 세포를 경계지워 주는 구조이나, 예외적으로 신장의 사구체에서는 기저막이 모세혈관의 혈관내피세포와 Bowman's capsule의 표피세포 사이에 존재하며, 중추신경계 조직에서는 혈관내피세포와 교세포(glial cell) 사이에 존재한다. 기저막은 안쪽 및 바깥쪽의 clear zone과 가운데 진하게 나타나는 lamina interna라는 구조로 이루어져 있으며 collagens (주로 type IV), chondroitin, heparan sulfate proteoglycan 및 laminin과 같은 다양한 당단백질로 이루어져 있다. 기저막은 구조적인지지, 세포 증식의 조절 및 여과 장벽 (filtration barrier) 역할을 한다. 따라서 기저막의 변화는 기능의 변화를 동반하게

된다.

망막 기저막은 정상적으로 연령이 증가할수록 두꺼워지며, 당뇨병 환자 및 실험 동물에서는 이와 같은 현상이 두드러지게 나타난다. 특히 inner capillary bed (nerve and ganglion layer)의 비후가 특징인데, 당뇨병에서 나타나는 이러한 변화는 갈락토스를 먹인 쥐나 개에서도 동일하게 나타난다. 당뇨병 환자의 망막에서 나타나는 특징적인 변화 중의 하나는 망막 미세혈관에서 선택적으로 pericyte의 소실이 일어난다는 것이다. 이러한 변화는 신생 혈관이 나타나는 것보다 선행하기 때문에 pericyte가 망막 혈관 세포의 증식을 억제하는 것으로 추정되고 있다. 이와 관련하여 Orledge와 D'Amore는 pericyte와 혈관 내피세포를 직접 접촉하도록 배양한 경우에는 혈관 내피세포의 증식이 억제된 반면, 직접 접촉을 하지 않도록 배양한 경우에는 이러한 효과가 관찰되지 않아 pericyte가 혈관내피세포의 증식에 매우 중요하며 pericyte의 소실이 당뇨병성 망막증의 발생에 매우 중요한 역할을 할 것으로 보고하였다.

신장에서 나타나는 변화는 Kimmelstiel과 Wilson이 기술한 바와 같이 사구체 기저막의 비후와 mesangium의 확장이 특징적이며, 이러한 변화는 수년에 걸쳐 서서히 진행되는 것으로 알려져 있다. 당뇨병 초기에는 사구체의 급성 비후가 나타날 수 있는데 이것이 전형적인 당뇨병 병변의 전단계인지는 불확실한 상태이다. 기저막의 비후는 소변내 알부민의 배설율과 관계가 있으며, 사구체 여과율과는 관계가 없는 것으로

되어 있다. Mesangium의 확장이 신장 기능 감소의 주요인으로 알려져 있는데 이는 mesangium이 확장됨에 따라 모세혈관의 표면적(여과 면적)이 감소됨에 기인한다. 한편 신장병증이 나타나는 세포생물학적 기전에 관하여는 기저막의 lamina lara externa에서 음전위를 띤 heparan sulfate proteoglycan의 감소가 음전위의 알부민에 대한 투과를 증가시켜 단백뇨가 발생할 것으로 생각되고 있으며, 사구체 여과 압력의 증가도 관계될 것으로 여겨진다. 섬유소의 분해가 감소되어 섬유소의 축적이 일어나고 이로 인해 전 모세혈관의 폐색이 관찰될 수 있다.

당뇨병 합병증의 발생에 있어 고혈당 이외의 인자에 대해서는 고혈당 가설보다 연구 결과가 훨씬 적으며, 알려진 바가 거의 없다. 최근 당뇨병 환자에서 증가되어 있는 혈장 유리 지방산이 당뇨병의 합병증 발생에 중요한 역할을 할 것이라는 연구 결과가 보고되어 관심을 끌고 있다. 기존의 연구들은 앞에서 기술한 바와 같이 당뇨병성 혈관 합병증의 병인을 고혈당에 의한 세포 손상에만 초점을 맞추어 온 것이 사실이다. 그러나 당뇨병 상태에서는 혈중 포도당 농도뿐만 아니라 혈중 유리지방산의 농도가 증가되어 있으며, 당뇨병 환자에서 indirect calorimeter로 당질 산화와 지질 산화율을 측정해 보면 당질 산화율은 감소되어 있는 반면에 지질 산화율은 뚜렷이 증가되어 있음을 관찰할 수 있다. Toborek 등은 혈관내피세포를 유리지방산과 같이 배양하였을 때 세포내 glutathione이 감소하고 알부민에 대한 투과성이 증가되며, glutathione 합성의 최초 과정에 관여하는  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase 억제제를

첨가하였을 때 유리지방산에 의한 혈관 내피세포 손상이 촉진됨을 보고하여 유리지방산이 혈관 내피세포의 손상에 관여할 것이라고 하였다. 그러나 유리 지방산이 당뇨병의 미세혈관 합병증에 관여한다는 연구는 아직 부족한 실정이다.

본 연구에서는 두충나무의 산지별 부위별 시료를 수집하여 50% methanol 추출물을 제조하여 혈당강하 및 당뇨합병증 억제 작용을 시험관내에서 검색하였으며 가장 효과가 우수한 시료로부터 활성 성분을 분리하여 구조를 결정하였다.

국내에서 재배되는 두충나무는 품종이 하나이기는 하지만 산지에 따른 성분 및 효능이 다를 수 있기 때문에 두충나무의 국내 산지별 부위별 시료를 수집하였다. 이들을 시험관내에서 혈당강하 및 당뇨병 합병증 억제 시험에 의하여 효능을 비교하였으며 bioassay-guided isolation에 의하여 활성 성분을 분리하여 그 구조를 분석하였다.

본 과제의 최종 목표인 두충의 모든 부위의 혼합물로부터 혈당강하 성분 및 당뇨합병증 억제 성분을 유효 성분으로 함유하는 소재의 생산 기술 개발을 위하여는 소재의 규격화 및 품질관리에 필요한 유효 성분의 구명이 선행되어야 하였다. 각 부위의 혼합에 의하여 성분의 수가 많아지면 활성 성분의 분리 정제가 더 어려워지므로, 활성 성분의 분리는 가장 활성이 높은 부위로부터 수행한 후 다른 부위에서의 함량을 분석하였다. 두충 각 부위의 당뇨조절 성분이 같을 수도 있고 다를 수도 있기 때문에 활성만 높다면 가능한 한 모든 부위의 활성 성분을 분리하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. 시료 수집

국내에서 재배되는 두충나무의 품종은 원두충 및 당두충이며, 전국적으로 주로 원두충이 재배된다. 품종에 따른 차이가 있을 수 있기 때문에 두 품종을 수집하였으며, 같은 품종일지라도 재배지에 따른 차이가 있을 수 있으므로 산지별 두충나무를 수집하였다. 두충나무는 잎, 가지, 열매, 껍질 등의 모든 부위에서 생리기능 조절 효과가 보고되기 때문에 부위별 시료를 수집하였다. 수집한 시료의 재배지는 표 1에 나타내었다.

### 2. 추출물 제조

산지별 부위별 두충 시료를 분쇄기로 분쇄하여 일정량 취하여 reflux용 flask에 넣는다. 20배(w/v)의 50% methanol을 2시간 동안 reflux를 이용하여 추출하였다. 3회 연속 추출한 후 여과지(Toyo No. 2 및 4)로 여과하였다. 이 여과액을 합하여 진공 감압 농축기를 이용하여 감압 건조시킨 후 추출물의 중량을 계산하였다. 그 추출 수율은 표 1에 나타내었다.

### 3. 용매에 의한 분획

가의 방법에 의하여 얻은 50% methanol 추출물 일정량에 20배(w/v)의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 분액여두에 넣고 증류수와 동량의 ethyl acetate를 가하여 진탕하여 방치시켜 분획시킨다. Ethyl acetate 층을 따로 취한 후 물층에 다시 동량의 ethyl acetate를 가하여 같은 방법으로 분획하였다. 마지막 ethyl acetate 층을 농축하였을 때 추출물의 양이 거의 없어질 때까지 또는 ethyl acetate 층이 거의 무색이 될 때까지 분획하였다. 이 ethyl acetate 층을 합하여 농축 건조하여 ethyl acetate 분획물로 하였다. 물층은 감압 농축하여 동결 건조하여 물 분획물로 하였다.

### 4. 당뇨조절성분의 분리

상기 분획된 ethyl acetate층을 ethyl acetate가 완전히 휘발할 때까지 농축하여 Sephadex LH-20 column chromatography로 분획하였다. 이를 다시 Bondapak C<sub>18</sub> column (125Å, 15-20µm, 7.8× 300 mm; Waters Co.)을 사용한 preparative high performance chromatograph(Waters Delta Prep 3000 system, Waters Co.)로 분획하였다. 이를 다시 µBondapak C<sub>18</sub> column(125Å, 10µm, 3.9 × 300 mm; Waters Co.)을 사용한 analytical HPLC(Jasco Co., Japan)로 단일 화합물로 정제하였다.

## 5. 당노조절성분의 구조 분석

분리한 순수 화합물은 Autospec-Ultima OA TOF Tandem mass spectrometer (Micromass, U.K.)에 의하여 측정된 electron spray ionization mass spectra 및 Bruker Avance 600 (14.1T) instrument(Bruker, Germany)에 의하여 측정된  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC spectrum의 해석에 의하여 구조를 결정하였다.

## 제 3절 결과 및 고찰

### 1. 추출 수율

수집한 시료의 재배지 및 50% methanol 추출시의 수율을 표 7에 나타내었다.



표 7. 산지별 부위별 두충의 추출 수율

재배지	품종	부위	50% methanol 추출시의 수율(%)
경상남도 하동	원두증	가지	3.0
		껍질	3.3
경상북도 의성	원두증	잎	5.0
		가지	6.8
		껍질	3.2
충청남도 공주	원두증	잎	8.8
		열매	3.1
		껍질	4.2
강원도 원주	원두증	잎	9.5
		껍질	4.7
경기도 수원	당주증	잎	9.3
		가지	3.1
		껍질	7.8
		순	7.7
		뿌리	2.5

## 2. 두충 추출물의 *in vitro* 혈당강하 작용 검증

산지별 부위별로 수집한 두충 추출물의 시험관내 혈당강하 작용을 검색하였다. 그 결과 시료로 사용한 모든 산지 및 부위에서 저해효과가 나타났다(표 8). 산지에 따른 뚜렷한 차이는 없었으며, 부위별로는 잎, 가지, 열매, 껍질의 순으로 저해효과가 높았다. 특히 강원도 원주산 잎의 추출물이 가장 높은 효과를 나타내었다.

## 3. 두충 추출물의 *in vitro* 당뇨합병증 억제 작용 검증

산지별 부위별로 수집한 추출물의 시험관내 당뇨합병증 억제 작용을 검색하였다(표 9).

표 8. 두층 추출물의 시험관내 혈당강하 효과

재배지	부위	농도 (mg/mL)	저해율(%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
경남 하동	가지	0.2	6.00	1.64
		0.5	15.0	
		1.0	30.5	
	껍질	0.2	4.00	3.41
		0.5	9.00	
		1.0	15.5	
경북 의성	잎	0.2	16.5	0.805
		0.5	32.0	
		1.0	61.3	
	가지	0.2	26.5	0.602
		0.5	52.5	
		1.0	66.0	
	껍질	0.2	4.00	2.30
		0.5	11.0	
		1.0	21.5	
충남 공주	잎	0.2	13.5	0.858
		0.5	28.0	
		1.0	58.7	
	종자	0.2	9.00	1.50
		0.5	21.0	
		1.0	34.0	
	껍질	0.2	3.00	3.36
		0.5	9.00	
		1.0	15.0	
강원 원주	잎	0.2	33.0	0.560
		0.5	45.0	
		1.0	73.0	
	껍질	0.2	7.00	1.22
		0.5	21.0	
		1.0	40.5	
경기 수원	잎	0.2	14.0	0.689
		0.5	37.0	
		1.0	72.3	
	줄기	0.2	5.00	2.10
		0.5	10.0	
		1.0	24.0	
	껍질	0.2	5.00	1.80
		0.5	13.0	
		1.0	27.5	
	순	0.2	10.5	0.844
		0.5	28.5	
		1.0	59.7	
뿌리	0.2	1.00	3.99	
	0.5	7.00		
	1.0	11.5		

표 9. 두충 추출물의 시험관내 당뇨합병증 억제 효과

Sample	Parts	Conc. (mg/ml)	Inhibition(%)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	
경남 하동	가지	0.2	24.2	0.475	
		0.5	56.8		
		1.0	67.1		
	껍질	0.2	25.8	0.541	
		0.5	55.3		
		1.0	59.1		
경북 의성	잎	0.2	27.8	0.684	
		0.5	45.1		
		1.0	56.4		
	가지	0.2	20.8	0.505	
		0.5	51.7		
		1.0	69.8		
	껍질	0.2	30.8	0.587	
		0.5	48.5		
		1.0	58.5		
	충남 공주	잎	0.2	33.8	0.454
			0.5	51.9	
			1.0	65.6	
열매		0.2	31.8	0.412	
		0.5	57.1		
		1.0	69.5		
껍질		0.2	27.6	0.600	
		0.5	53.8		
		1.0	55		
강원 원주	잎	0.2	28.4	0.457	
		0.5	55.0		
		1.0	67.8		
	껍질	0.2	21.2	0.799	
		0.5	50.4		
		1.0	49		
경기 수원	잎	0.2	26.8	0.479	
		0.5	46.0		
		1.0	74.5		
	가지	0.2	24	0.795	
		0.5	43.8		
		1.0	52.9		
	껍질	0.2	22.0	0.815	
		0.5	41.5		
		1.0	53.4		
	순	0.2	29.1	0.827	
		0.5	44.2		
		1.0	64		
	뿌리	0.2	26.4	0.573	
		0.5	50.4		
		1.0	59.9		

#### 4. 두층으로부터 당뇨조절 성분의 분리 및 구조 분석

##### 가. 당뇨조절 성분의 분리

두층 추출물의 시험관내 혈당강하 작용 및 당뇨합병증 억제 작용을 검색한 결과 모든 산지 및 부위에서 활성을 보였다. 두층 각 부위의 활성 성분이 부위에 따라 다를 수도 있고 같을 수도 있지만 현재까지 두층의 생리기능조절 성분은 여러 부위에 공통적으로 분포하는 경향이 높으므로 활성이 높은 부위를 대상으로 활성 성분을 분리 동정한 후 다른 부위에서의 함량을 구하였다.

또한 두층의 혈당강하 작용 및 당뇨합병증 억제 작용이 서로 다른 성분에 의하여 일어날 수도 있고 동일한 성분에 의하여 일어나는 것일 수도 있다. Bioassay-guided fractionation 과정 중 혈당강하 및 당뇨합병증 억제 작용 두 가지 bioassay를 동시에 시험하여 두 효과 모두가 인정되는 분획물을 찾아 나갔다.

강원도 원주산 잎의 50% methanol 추출물이 시험관내 혈당강하 및 당뇨합병증 억제 작용이 가장 높아서 이것을 대상으로 활성 물질을 분리하였다. 50% MeOH 추출물을 ethyl acetate 및 물로 분획한 결과 ethyl acetate 분획물의 수율은 낮았으나 저해활성이 50% methanol 추출물보다 증가하였다(표 10, 표 11).

표 10. 두충엽의 용매 분획물의 시험관내 혈당강하 효과

분획물	Yield from 50% MeOH extract	농도(mg/ml)	저해율(%)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Ethyl acetate	4.0	0.1	41	0.138
		0.2	58	
		0.5	90	
		1.0	100	
물	84.6	0.1	13	0.372
		0.2	24	
		0.5	56	
		1.0	86	

표 11. 두충엽의 용매 분획물의 시험관내 당뇨합병증 억제 효과

분획물	농도(mg/ml)	저해율(%)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Ethyl acetate	0.1	42.1	0.122
	0.2	69.1	
	0.5	97.5	
	1.0	100.0	
물	0.1	33.1	0.274
	0.2	42.2	
	0.5	58.2	
	1.0	77.3	

두층엽 ethyl acetate 분획물이 물 분획물에 비하여 시험관내 혈당강하 및 당뇨병증 억제작용이 높았으므로, ethyl acetate 분획물을 Sephadex LH-20 column chromatography로 분획하여 시험관내 혈당강하 및 당뇨병증 억제 활성을 시험하였다 (표 12, 표 13).

표 12. Sephadex LH-20 column chromatography로 분획 후의 시험관내 혈당강하 활성

분획물	Yield from Ethyl acetate fraction	농도(mg/ml)	저해율(%)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
A	9.7	0.2	2	
B	12.0	0.2	6	
C	23.4	0.2	11	
D	13.3	0.02	14	0.0628
		0.1	60	
		0.2	92	
E	14.1	0.02	19	0.0524
		0.1	71	
		0.2	93	
F	7.5	0.02	8	0.162
		0.1	34	
		0.2	60	

표 13. Sephadex LH-20 column chromatography로 분획 후 당뇨합병증 억제 효과

분획물	농도(mg/ml)	저해율(%)
A	0.2	47.5
B	0.2	49.8
C	0.2	56.3
D	0.02	9.6
	0.2	93.0
E	0.02	15.9
	0.2	100.0
F	0.02	11.1
	0.2	94.5

나. 당뇨조절 성분의 구조 분석

두충엽의 Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 분획물 중 분획물 E가 in vitro 혈당강하 및 당뇨합병증 억제 효과가 높았으므로 이 분획물로부터 각종 chromatography에 의하여 당뇨조절 성분으로서 EU-1, EU-4, EU-6의 세 화합물을 분리 하였다.

1) EU-1의 구조분석

원주산 두충엽으로부터 당뇨조절 성분으로 분리한 EU-1의 질량분석기(High resolution tandem mass spectrometer; 영국 Micromass사 제품; 모델명 Autospec-Ultima OA TOF)에 의한 이에스아이 네거티브 질량분석 스펙트럼(ESI negative mass spectrum)을 측정한 결과 (그림 1) m/z 596에서 분자 이온 피크



(molecular ion peak)를 보여 분자량은 596이며 분자식은  $C_{26}H_{28}O_{16}$ 인 것으로 확인되었다. 이 화합물의 고성능 핵자기공명 분광분석기(High resolution NMR spectrometer; 독일 Bruker사 제품; 모델명 AVANCE 600)에 의한 핵자기공명 분광 스펙트럼(NMR spectrum)을 분석한 결과 양성자-핵자기공명( $^1H$ -NMR)의 저자장 측에 나타난 시그널은 플라보노이드류 물질의 패턴을, 그리고 고자장 측에서는 두 개의 당이 존재하는 것으로 나타났다. 특히 저자장 측의 6.90ppm(1H,  $J=8.2$ Hz, H-5'), 7.32ppm(1H,  $J=1.7$ Hz, H-2')의 2개의 이중선(doublet)의 신호와 7.29ppm(1H,  $J_1=1.7$ Hz,  $J_2=8.2$ Hz, H-6')의 1개의 이중선-이중선의 신호는 방향핵에서 볼 수 있는 특징적인 1',3',4'-위치에 3개의 치환기를 가진 벤젠핵의 존재를 나타내고 있어, 플라보노이드 부분구조 B환의 5',2',6'-의 메틴 양성자에 각각 귀속하였으며, 이들의 결합정수, 결합패턴 그리고  $^1H$ - $^1H$  COSY(correlation spectroscopy)에서의 H-5'와 H-6'의 상관피크 등의 존재로도 확인되었다. 그리고 6.18ppm(1H), 6.36ppm(1H)의 시그널은 A환 상의 6 및 8위의 양성자로 귀속하였다. 양성자 핵자기공명 스펙트럼의 6.39ppm 및 6.20ppm의 단일선 신호로부터 5,7-다이하이드록시플라보놀(5,7-dihydroxyflavonol)의 존재를 확인하였다. 7.70ppm에서의 단일선 및 7.58ppm 및 6.87ppm ( $J=8.3$  Hz)에서의 이중선은 3',4'-다이하이드록시(dihydroxy) 구조를 의미하며 이는 퀴세틴의 방향족 B 환과 일치한다. 또한 85.49( $J=7.6$ Hz)와 84.75( $J=7.6$ Hz)에서의 이중선은 아노머성 양성자(anomeric proton)임을 보여주었다. 5.49ppm(d,  $J=7.6$ Hz)에서의 아노머성 양성자(anomeric

proton)을 시작으로 COSY(correlation) 및 HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) 실험은 두 개의 당을 확인시켰다. HMBC 실험에서 아노머성 양성자(H-1" :  $\delta$  5.49) 및 C-3 ( $\delta$  135.6)의 결합 위치는 3-하이드록시 기(hydroxy group)에 당이 치환되어 있음을 입증하였다. 두 번째 아노머성 양성자(H-1"' :  $\delta$  4.75) 및 C-2"( $\delta$  82.7) 사이의 HMBC 상관관계는 아라비노스와 포도당의 결합이 1 $\rightarrow$ 2임을 증명하였다. 6원 고리(Six-membered ring)의 전형적인 결합상수 및 HMBC 실험으로부터 당의 stereochemistry를 확인하였다.

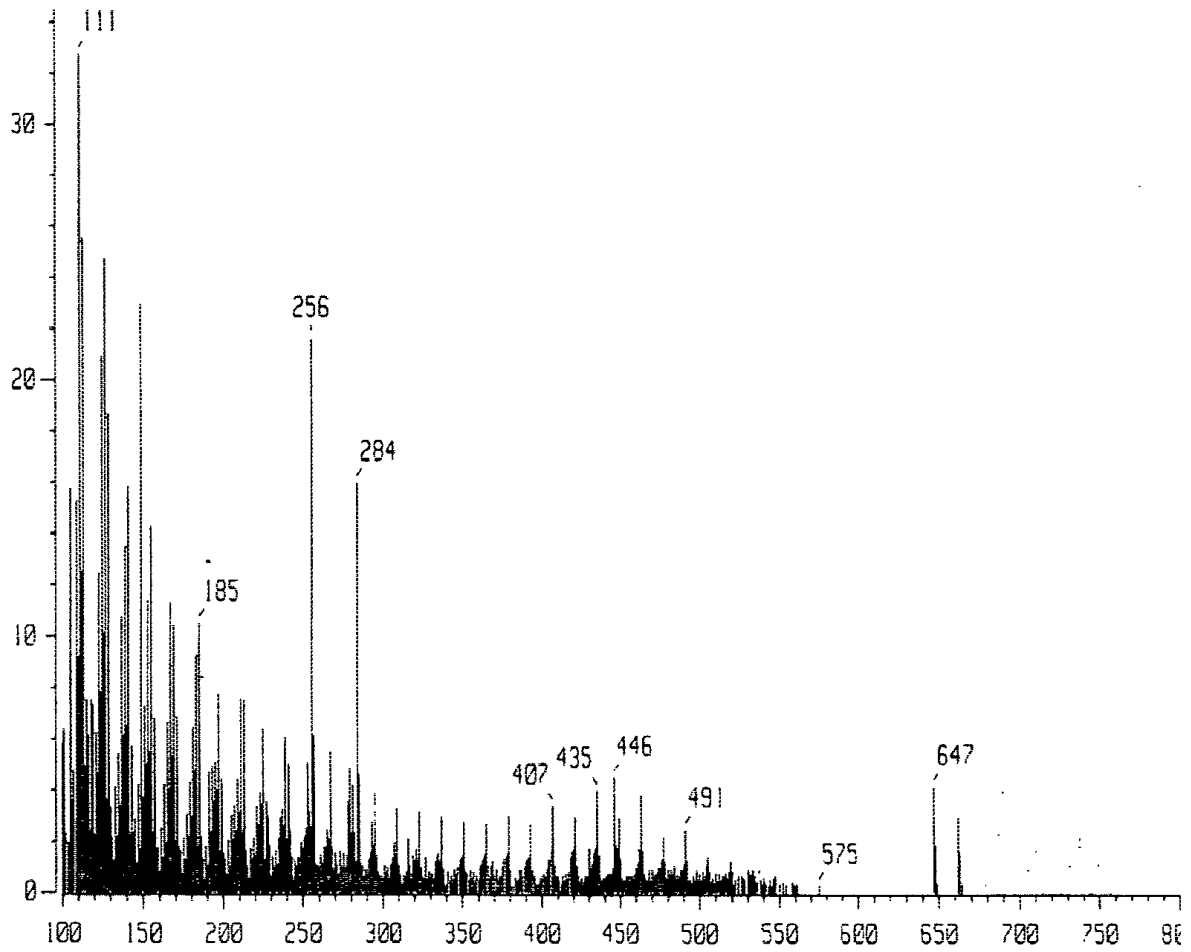


그림 1. EU-1의 EI mass spectrum

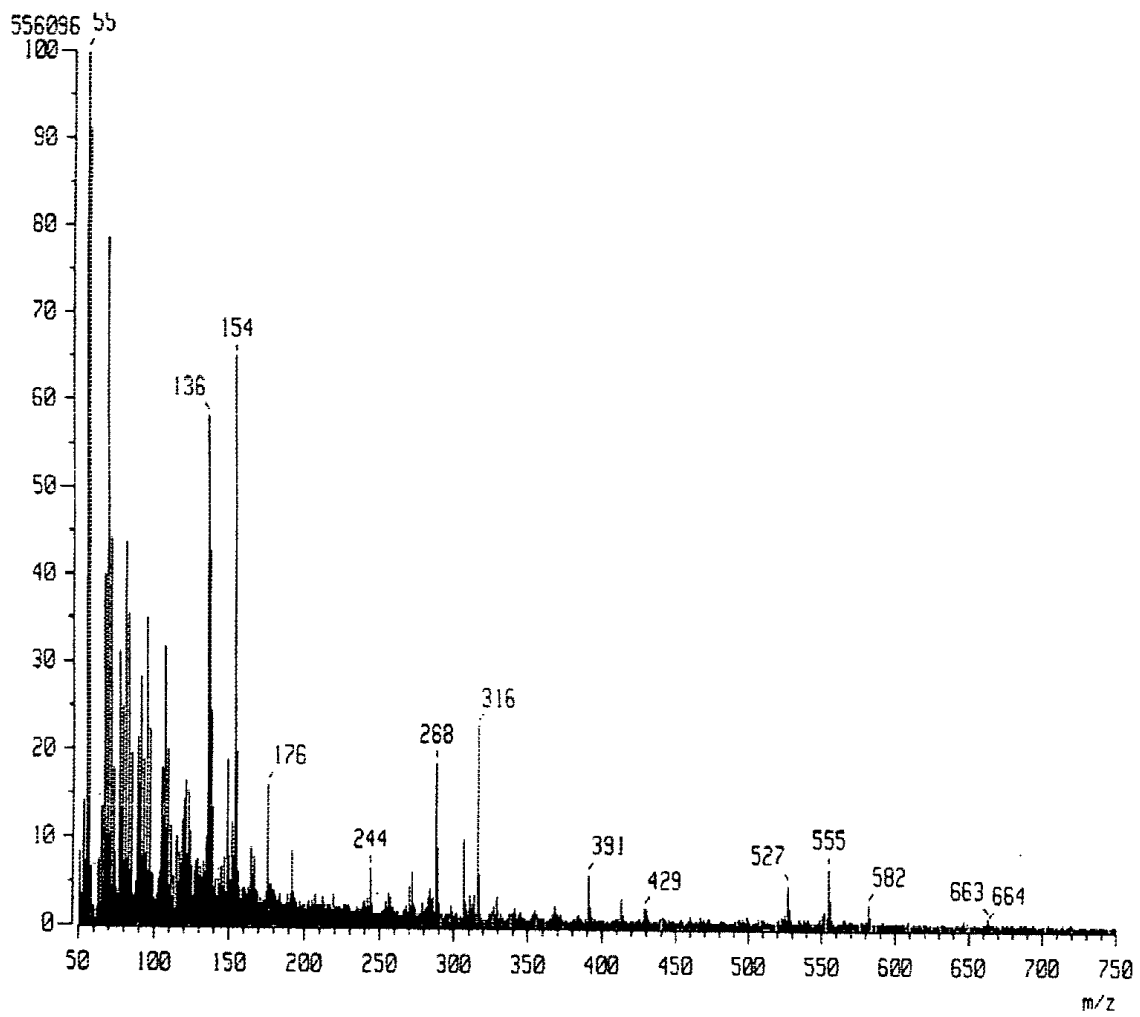


그림 2. EU-1의 FAB mass spectrum

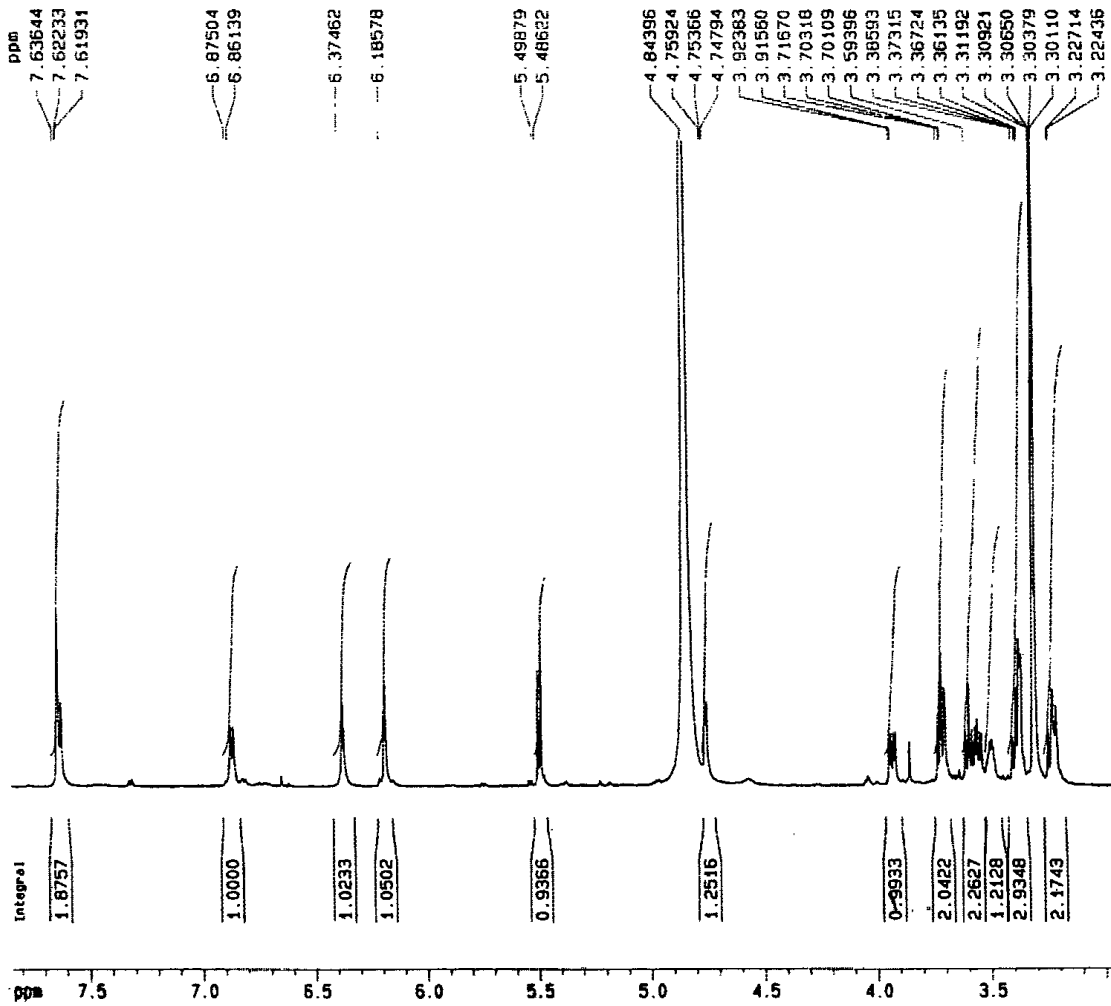


그림 3. EU-1의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum

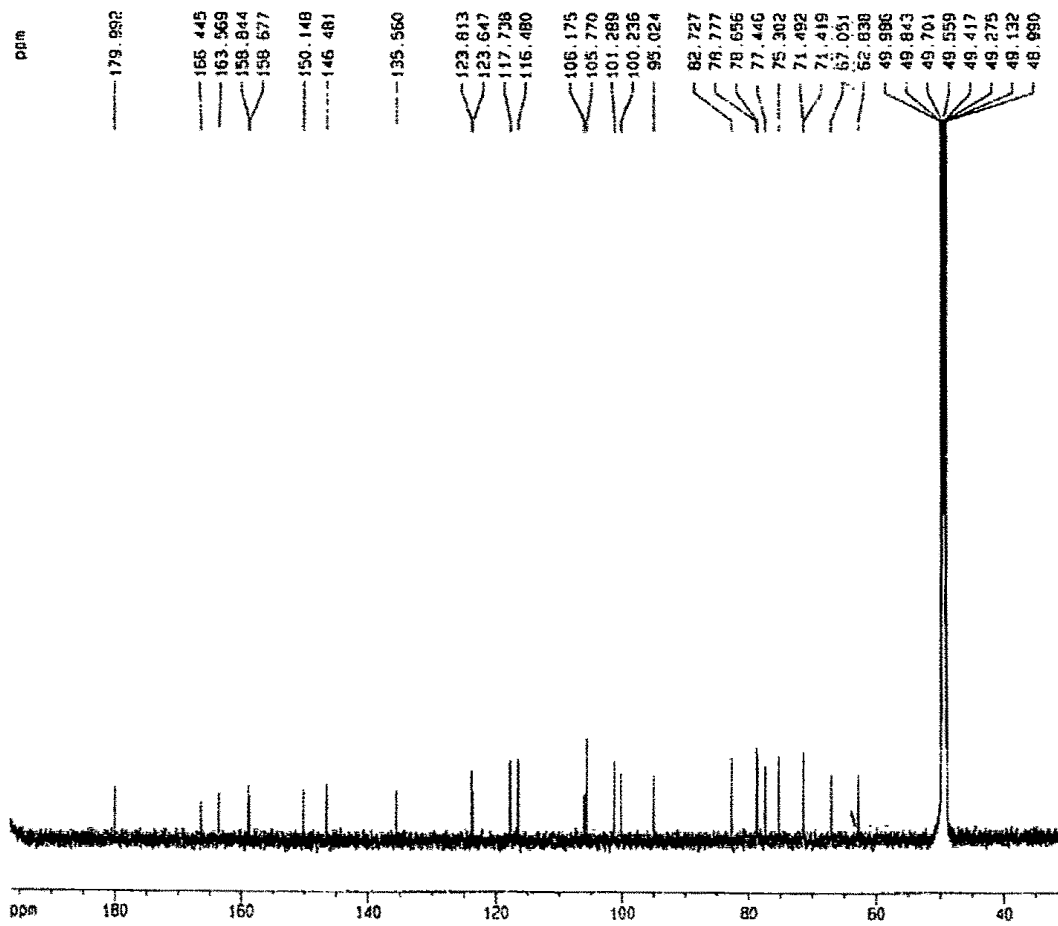


그림 4. EU-1의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum

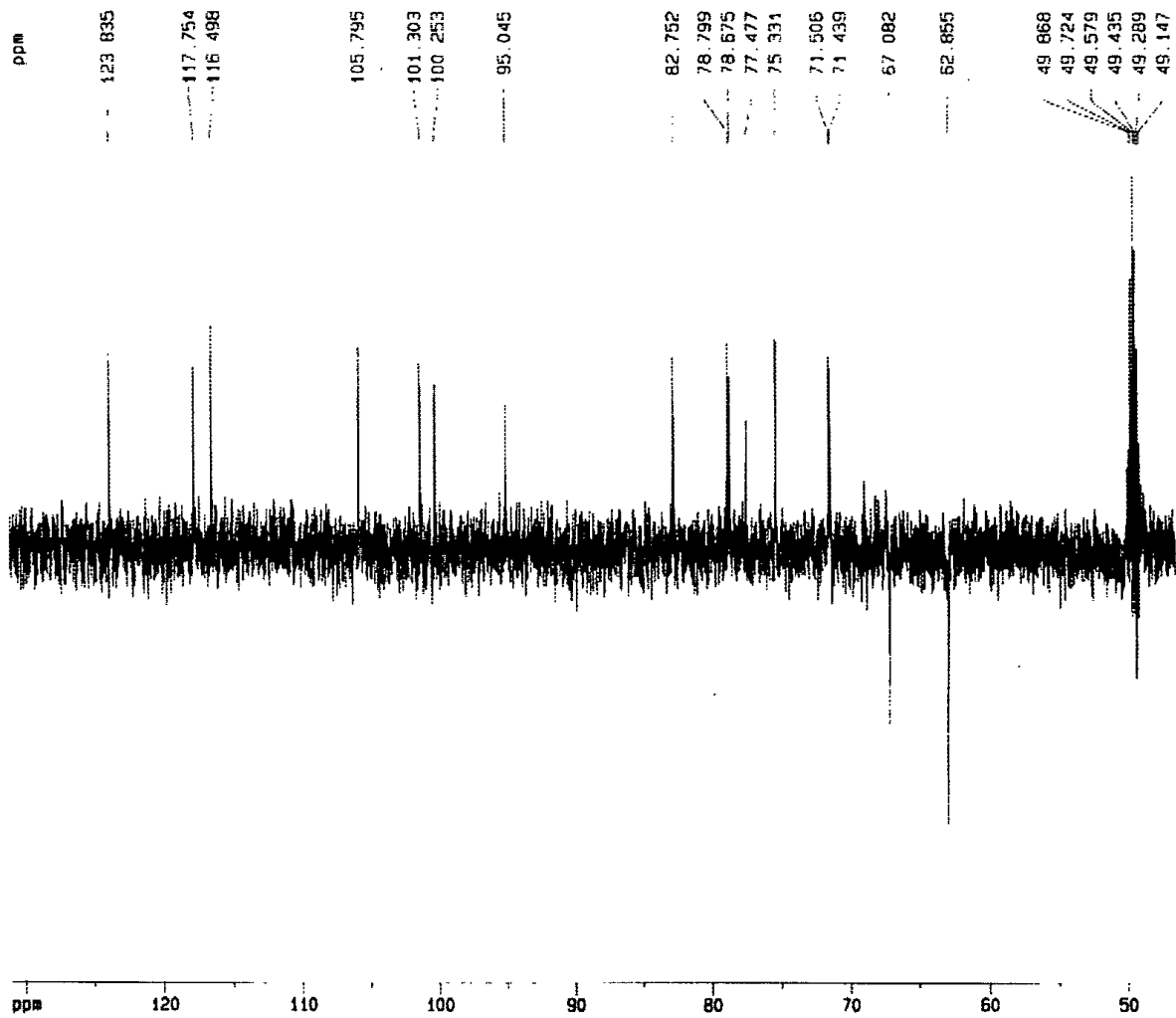


그림 5. EU-1의 DEPT NMR spectrum

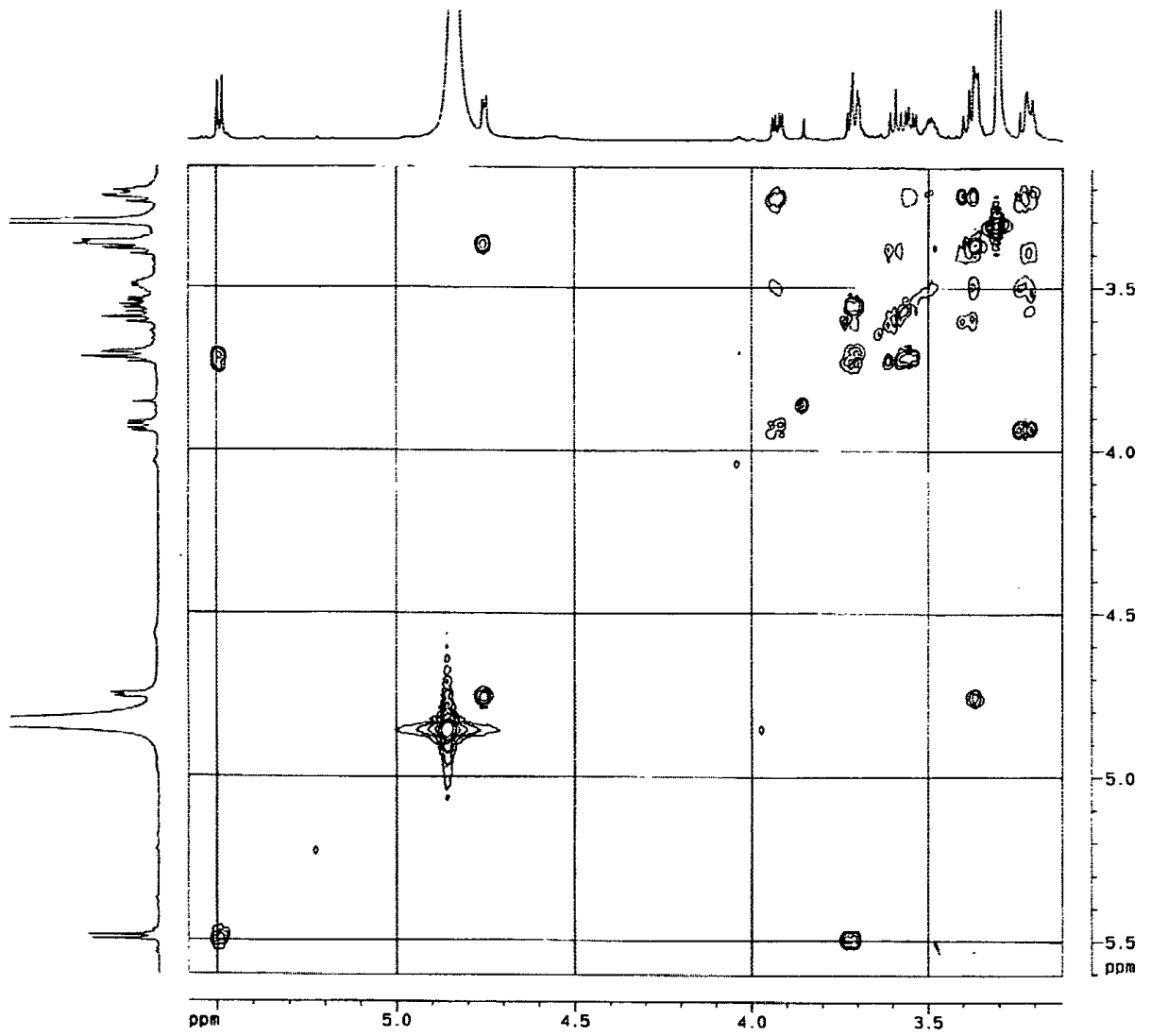


그림 6. EU-1의 COSY spectrum



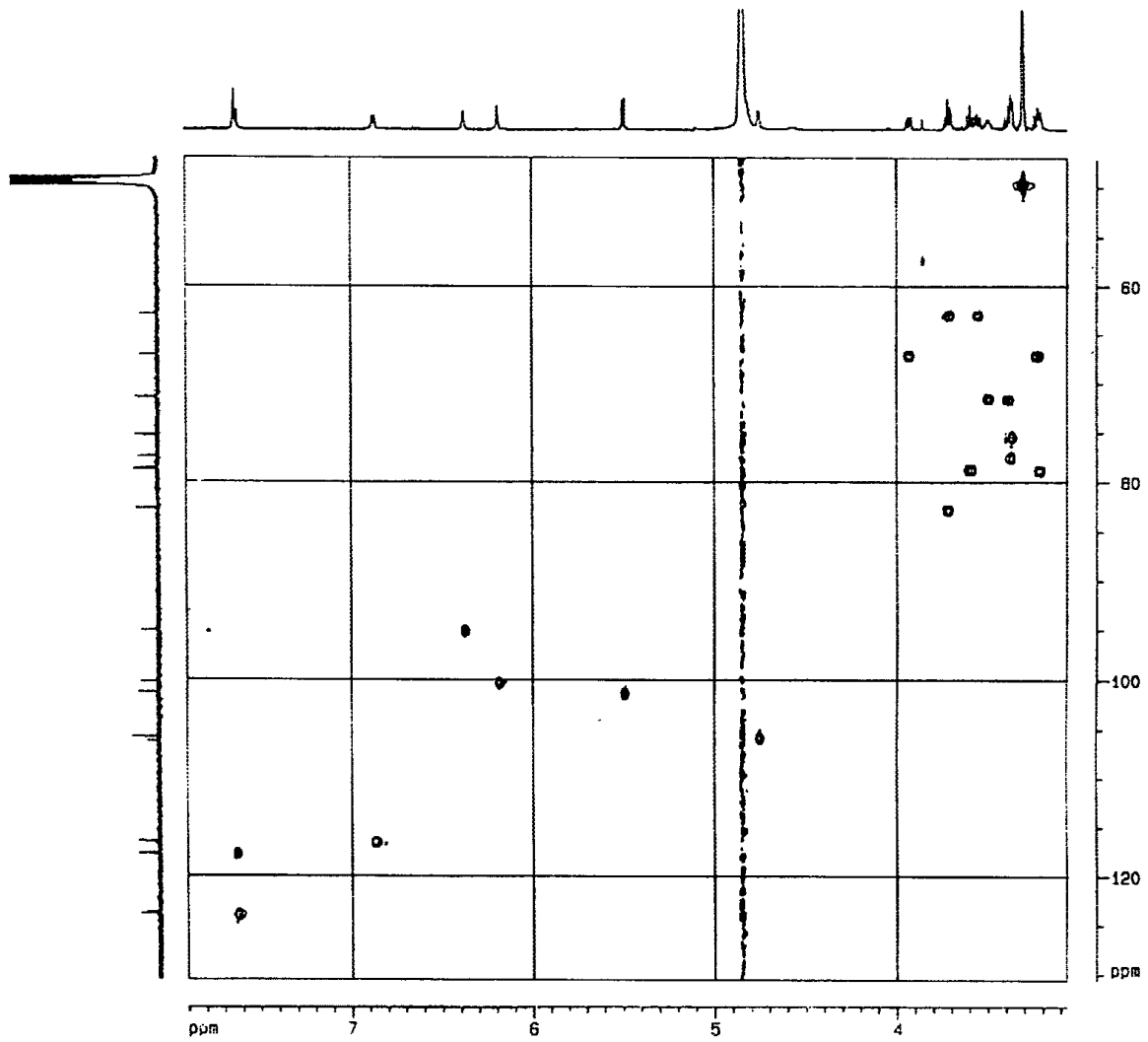


그림 7. EU-1의 HMQC spectrum

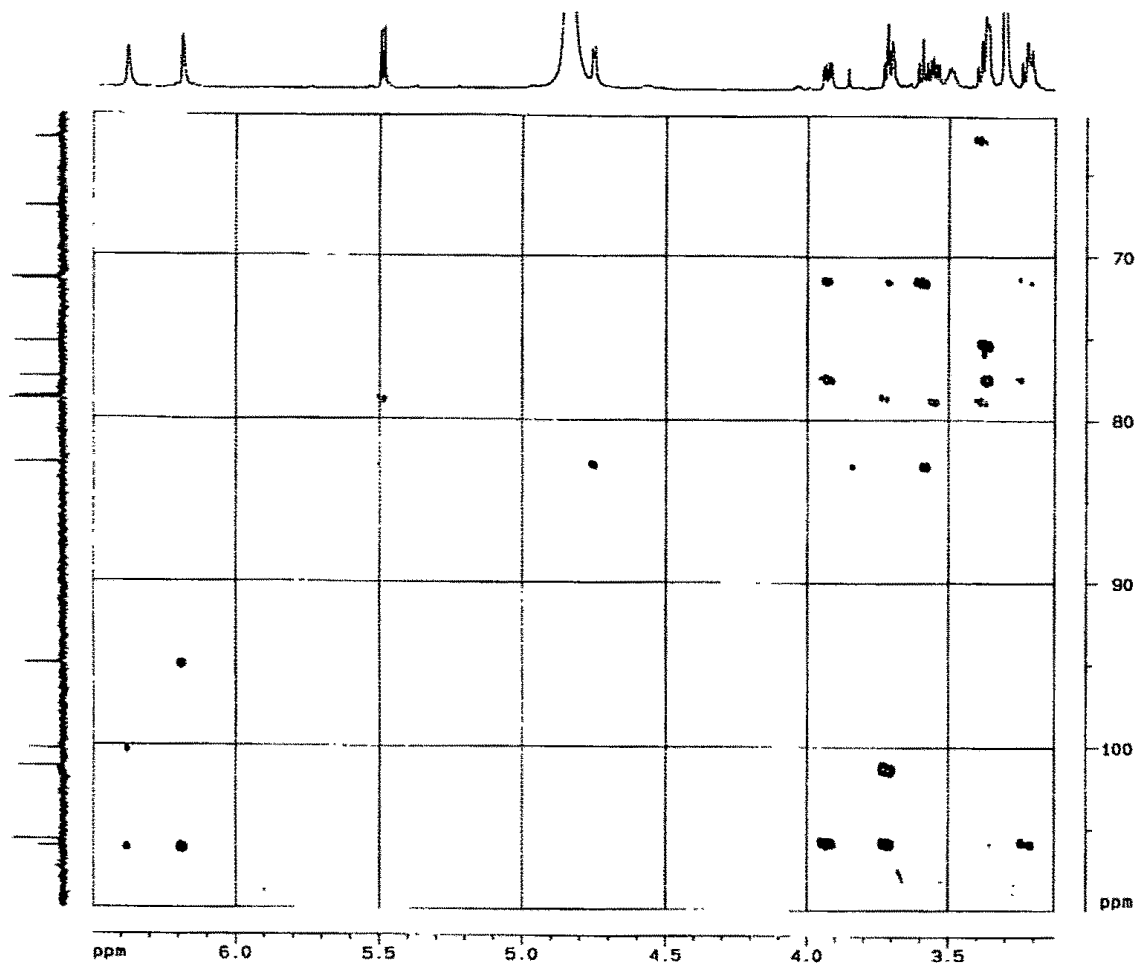


그림 8. EU-1의 HMBC spectrum

## 2) EU-4의 구조 분석

EU-4의 질량분석기(High resolution tandem mass spectrometer ; 영국 Micromass 사 제품; 모델명 Autospec-Ultima OA TOF)에 의한 이에스아이 네거티브 질량분석 스펙트럼(ESI. negative mass spectrum)을 측정한 결과  $m/z$  448에서 분자 이온 피크 (molecular ion peak)를 보여 분자량은 448이며 분자식은  $C_{21}H_{20}O_{11}$ 인 것으로 확인되었으며, 단편의 이온피크(fragment ion peak)는  $m/z$  286이었다. 이 화합물의 고성능 핵자기공명 분광분석기(High resolution NMR spectrometer; 독일 Bruker사 제품; 모델명 AVANCE 600)에 의한 핵자기공명자기공명 분광분석기(High resolution NMR spectrometer; 독일 Bruker사 제품; 모델명 AVANCE 600)에 의한 핵자기공명 분광 스펙트럼(NMR spectrum)을 분석한 결과 양성자-핵자기공명( $^1H$ -NMR)의 저자장 측에 나타난 시그널은 플라보노이드류 물질의 패턴을, 그리고 고자장 측에서는 한 개의 당이 존재하는 것으로 나타났다. 저자장 측의 6.39ppm, 6.20ppm의 2개의 단일선(singlet)의 시그널은 5,7-다이하이드록시플라보놀(dihydroxyflavonol)의 아노머성 A 고리(anomeric A-ring)의 전형적인 2H AX 시스템을 보여주었다. 양성자 핵자기공명 스펙트럼에서 7.70ppm에서의 단일선 및 7.58 및 6.87ppm ( $J=8.3\text{Hz}$ )의 두 개의 이중선은 3',4'-다이하이드록시(dihydroxy functional) 구조를 보여주어 퀴세틴의 방향족 B 환과 일치하였다. 양성자 및 탄소 핵자기 공명 스펙트럼, 양성자-양성자 COSY 및 HMBC에 의한 배당체 신호는  $\beta$ -D-포도당임을 입증하였다.

분광 스펙트럼(NMR spectrum)을 분석한 결과 양성자-핵자기공명( $^1\text{H-NMR}$ )의 저자장 측에 나타난 시그널은 플라보노이드류 물질의 패턴을, 그리고 고자장 측에서는 한 개의 당이 존재하는 것으로 나타났다. 특히 저자장 측의 6.36ppm, 6.17ppm( $J=1.9\text{Hz}$ )의 2개의 이중선(doublet)의 시그널은 5,7-다이하이드록시플라보놀(dihydroxyflavonol)의 아노머성 A고리(anomeric A-ring)의 전형적인 2H AX 시스템을 보여주었다. 양성자 핵자기공명 스펙트럼에서의 8.05 및 6.88ppm ( $J=8.9\text{Hz}$ )의 두 개의 이중선은 방향족 환 B에서 AB 시스템을 보여주었다. 양성자 핵자기공명 스펙트럼 및 양성자-양성자 COSY(correlation spectroscopy) 실험은 배당체 수소의 위치를 보여주었다. C-3(135.8ppm) 및 anomeric ( $\text{H-1}''$ ) 수소(5.22ppm) 사이의 HMBC(heteronuclear multiple bond correlation)는 포도당의 위치가 3-하이드록시(hydroxy)임을 입증하였다. 아노머성 양성자(anomeric proton)의 결합 상수가 7.6Hz이므로  $\beta$ -포도당이였다.

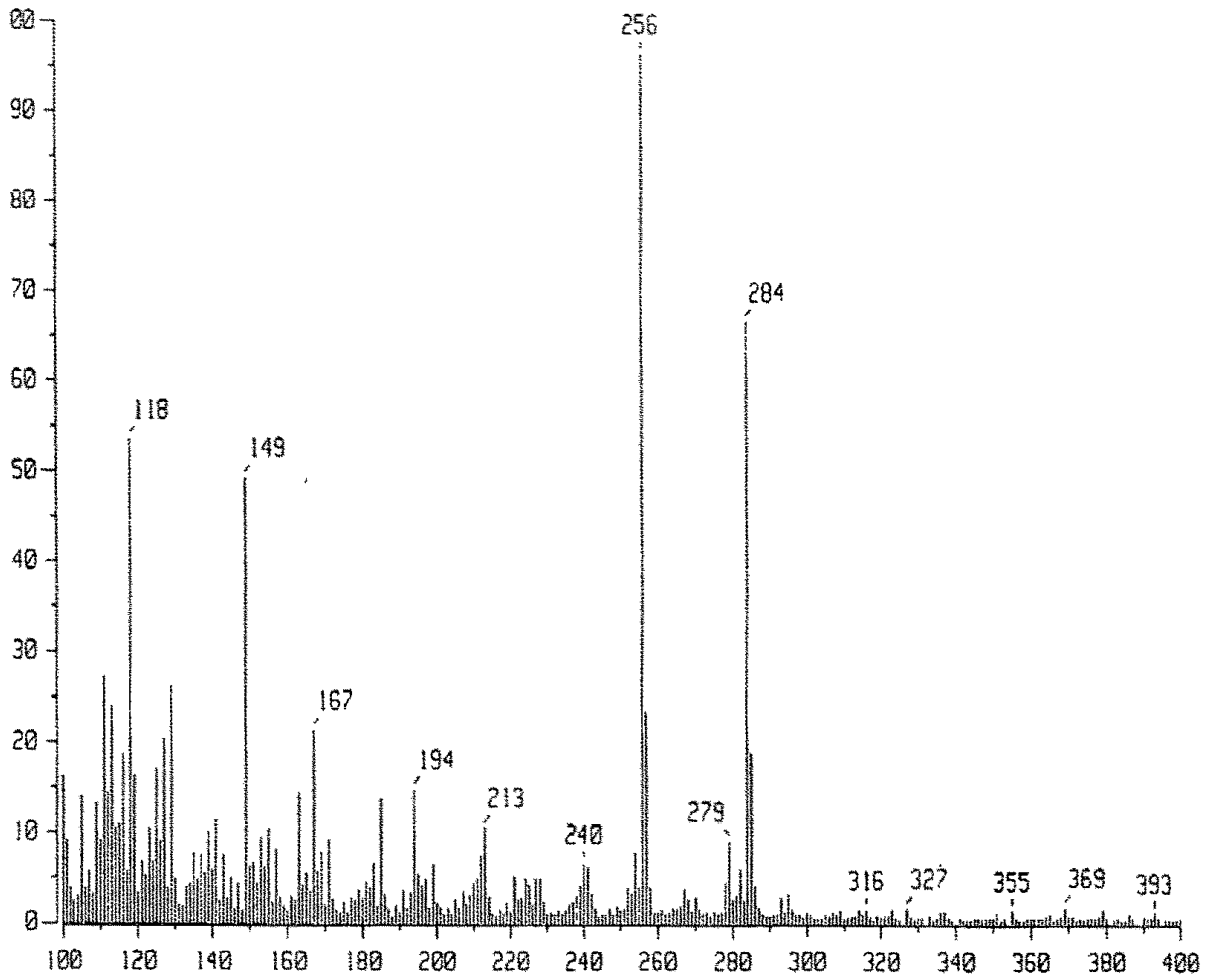


그림 9. EU-4의 EI mass spectrum

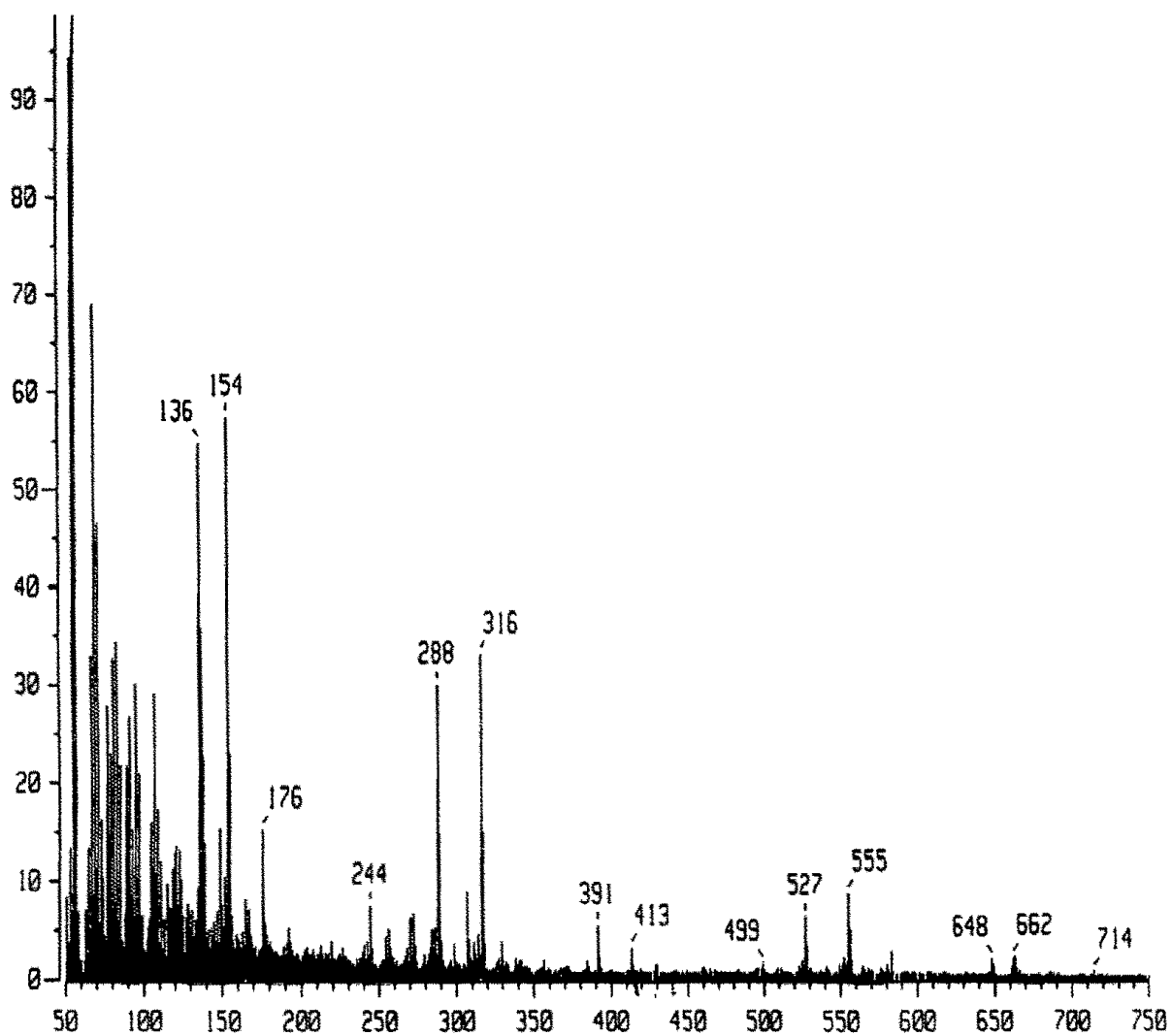


그림 10. EU-4의 FAB mass spectrum

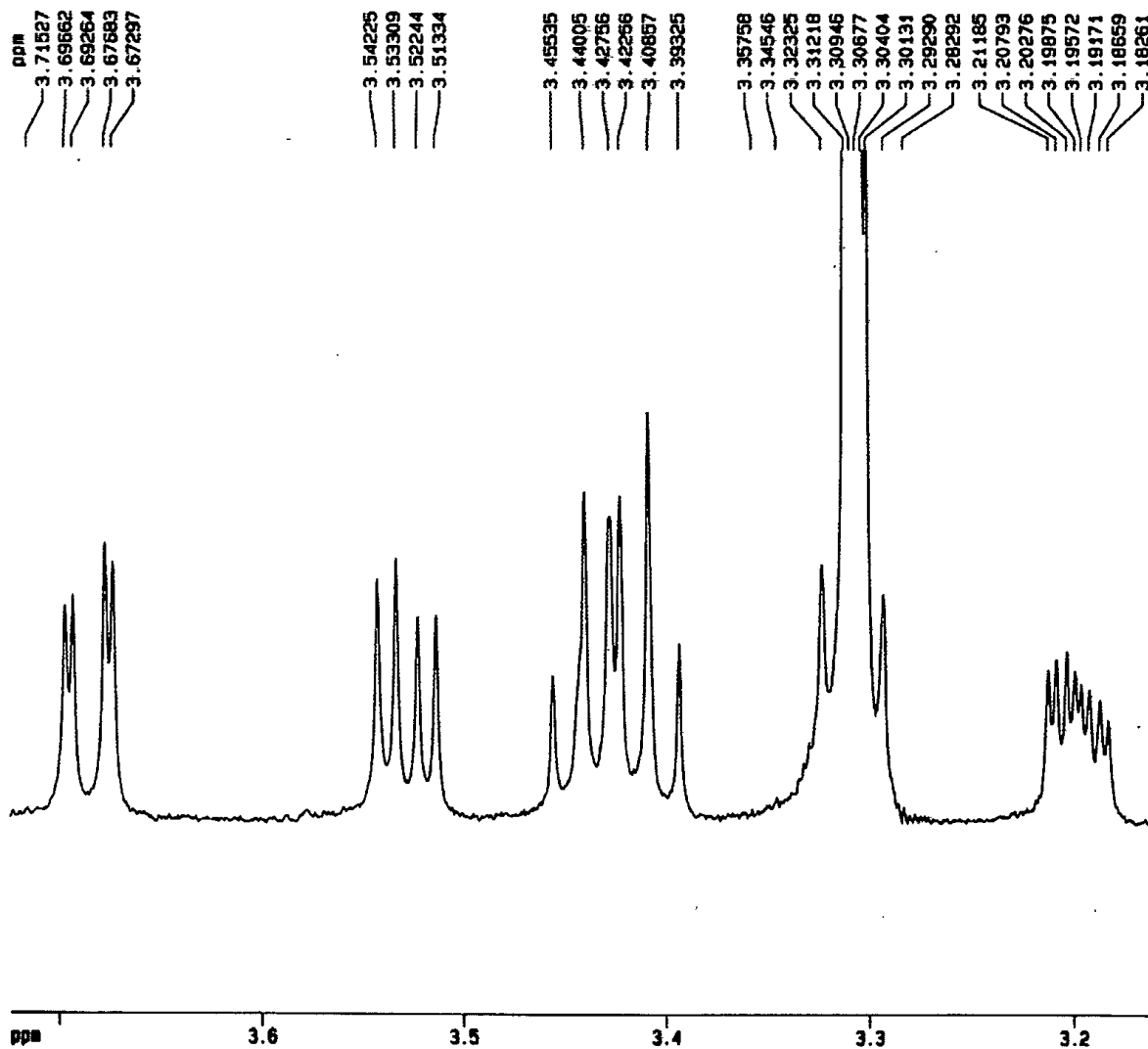


그림 11. EU-4의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum

EU-4 in MeOH-d4

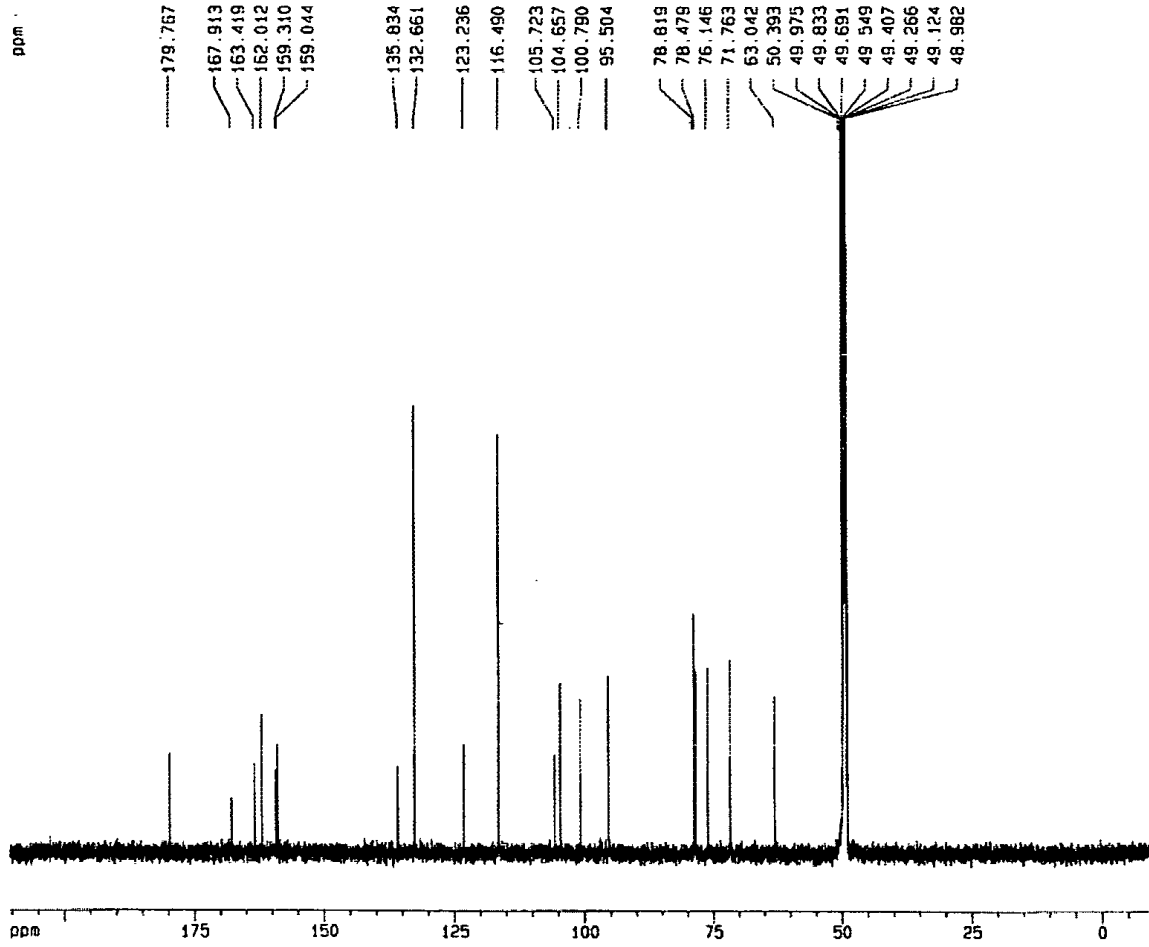


그림 12. EU-4의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum



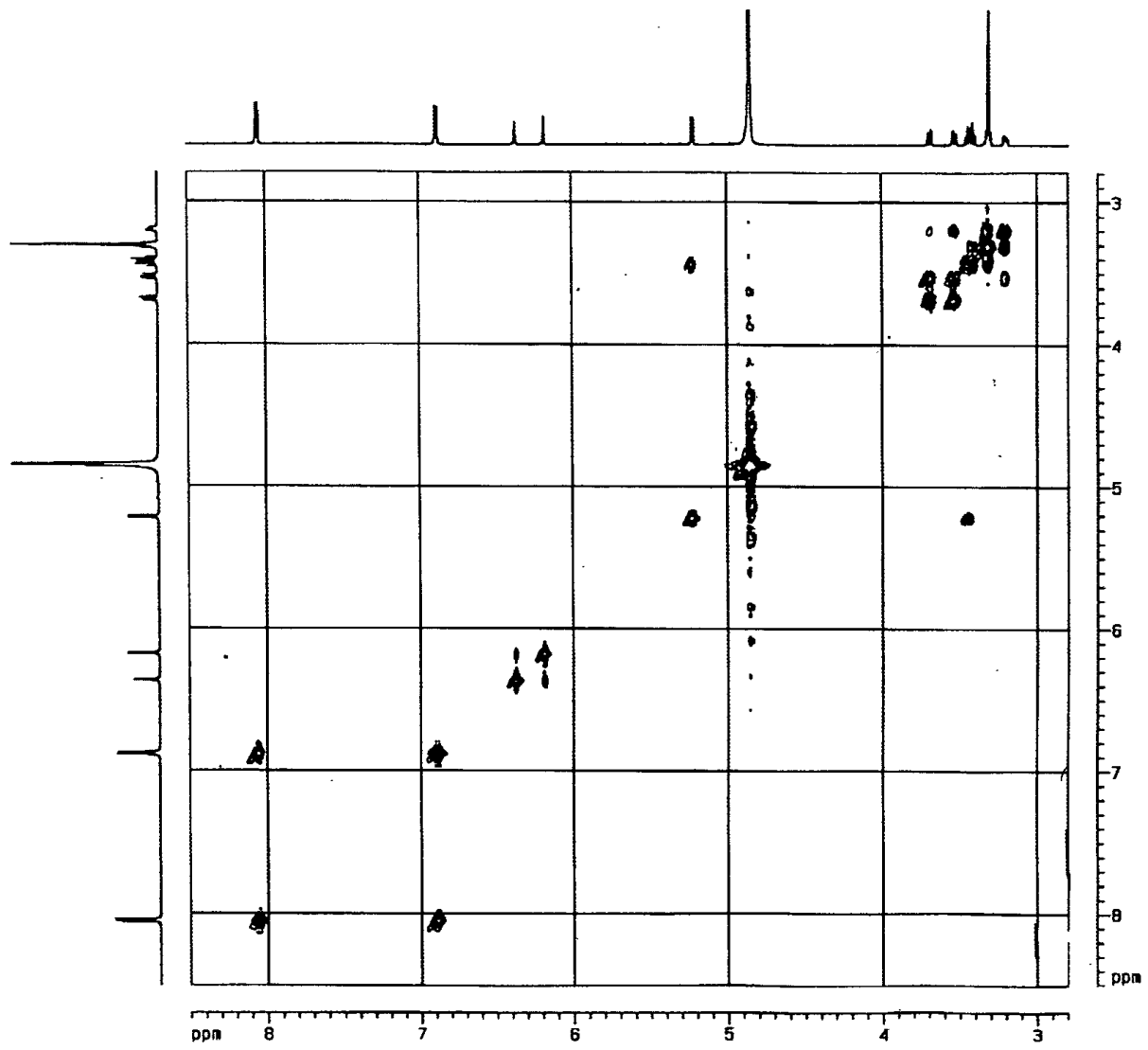


그림 13. EU-4의 COSY spectrum

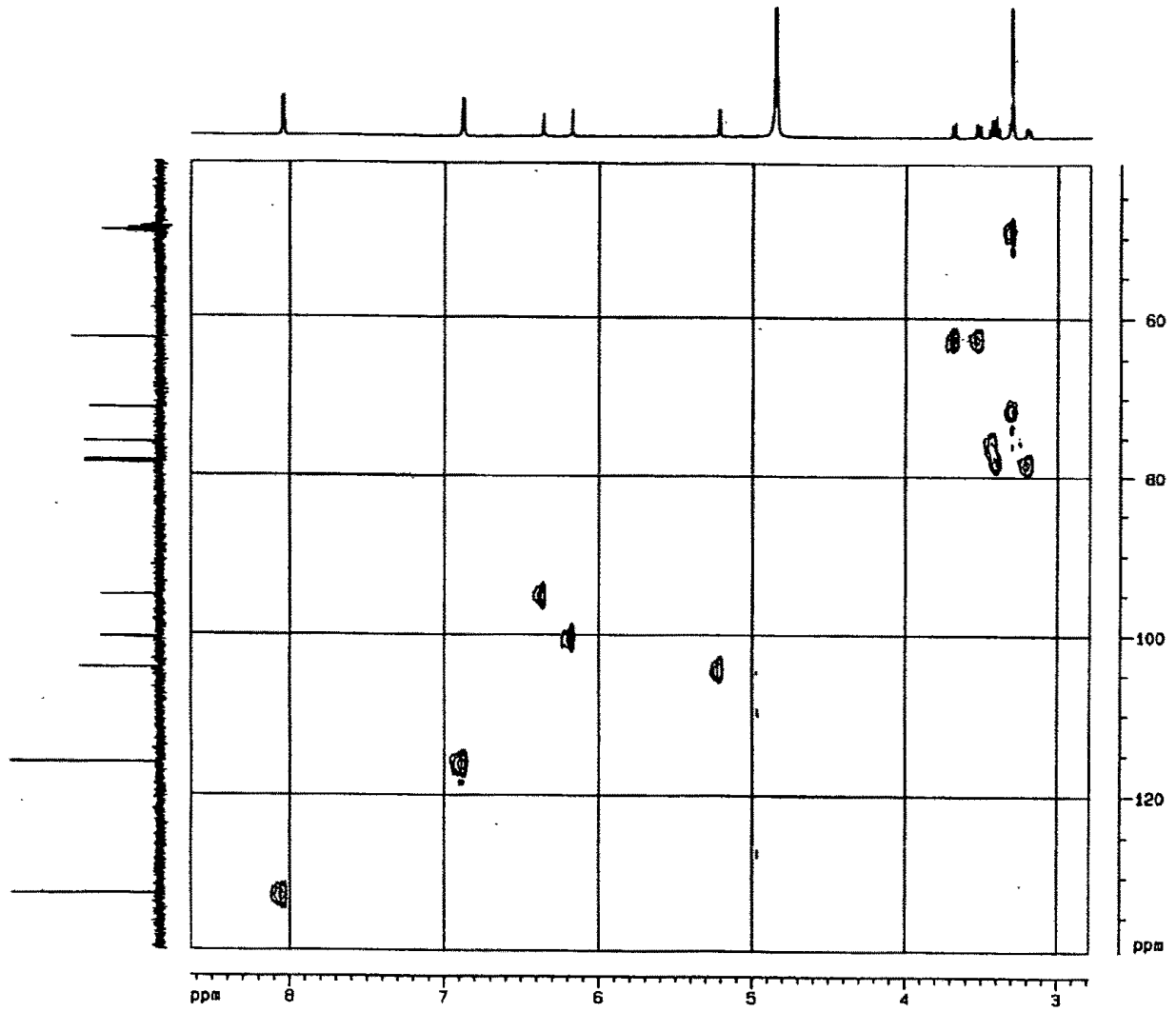


그림 14. EU-4의 HMQC spectrum

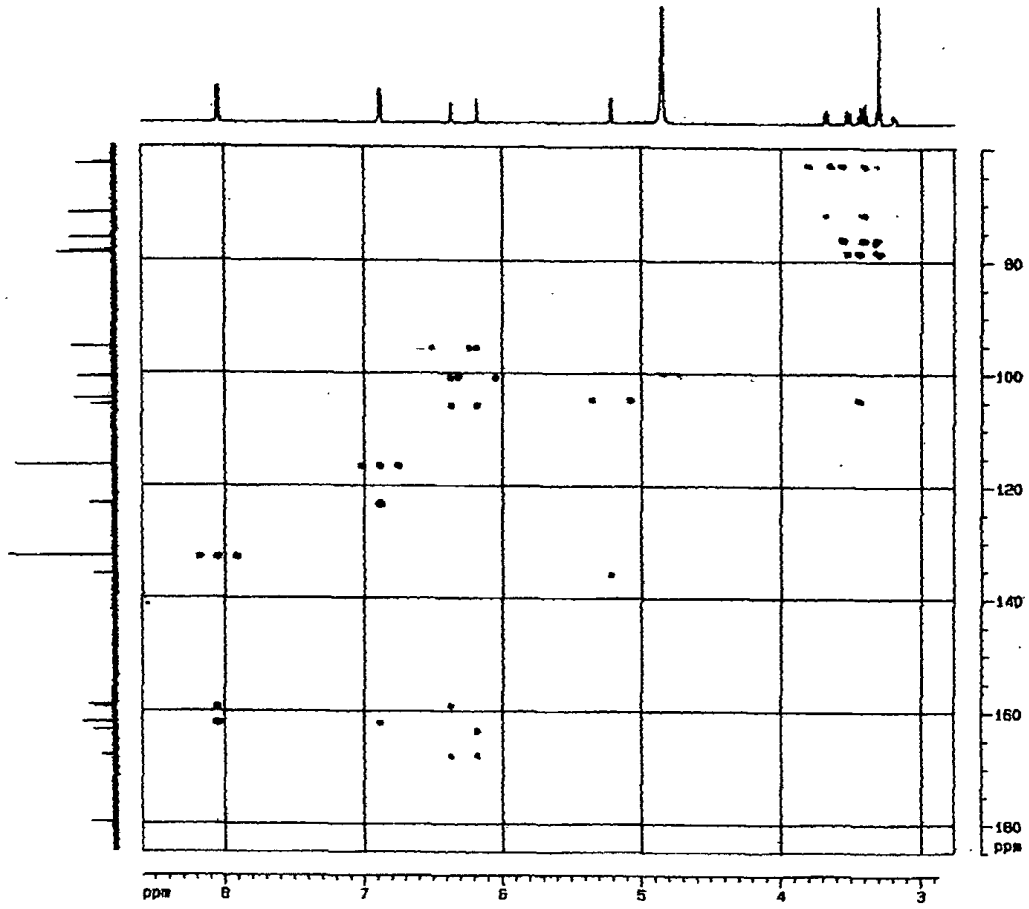


그림 15. EU-4의 HMBC spectrum

#### 다. EU-6의 구조분석

EU-6의 질량분석기(High resolution tandem mass spectrometer ; 영국 Micromass 사 제품; 모델명 Autospec-Ultima OA TOF)에 의한 이에스아이 네거티브 질량분석 스펙트럼(ESI negative mass spectrum)을 측정한 결과  $m/z$  464에서 분자 이온 피크(molecular ion peak)를 보여 분자량은 464이며 분자식은  $C_{21}H_{20}O_{12}$ 인 것으로 확인되었다. 이 화합물의 고성능 핵자기 공명 분광 분석기에 의한 핵자기 분광 스펙트럼을 분석한 결과 양성자-핵자기 공명의 저자장 측에 나타난 시그널은 플라보노이드류 물질의 패턴을, 그리고 고자장 측에서는 한 개의 당이 존재하는 것으로 나타났다.

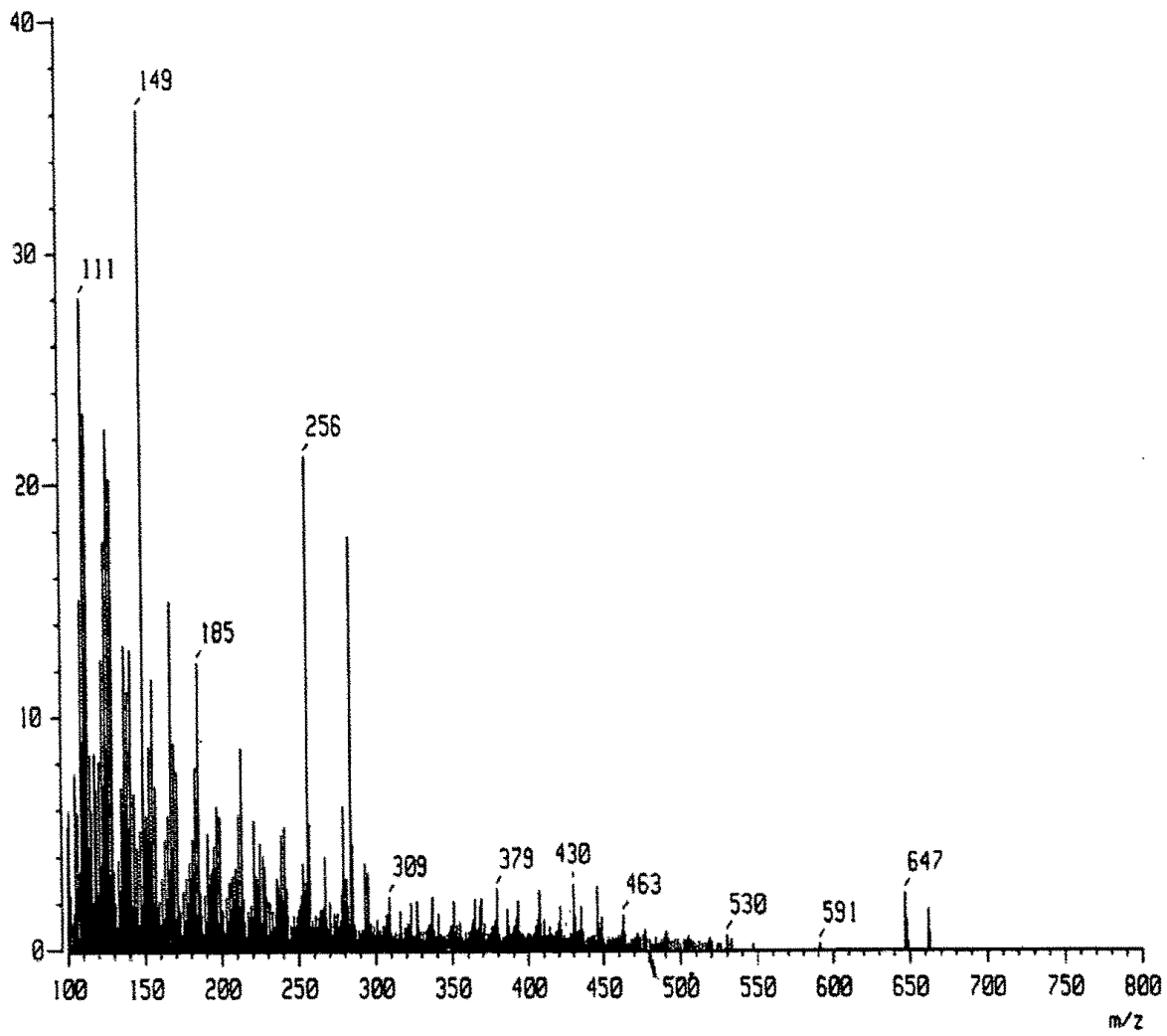


그림 16. EU-6의 EI mass spectrum

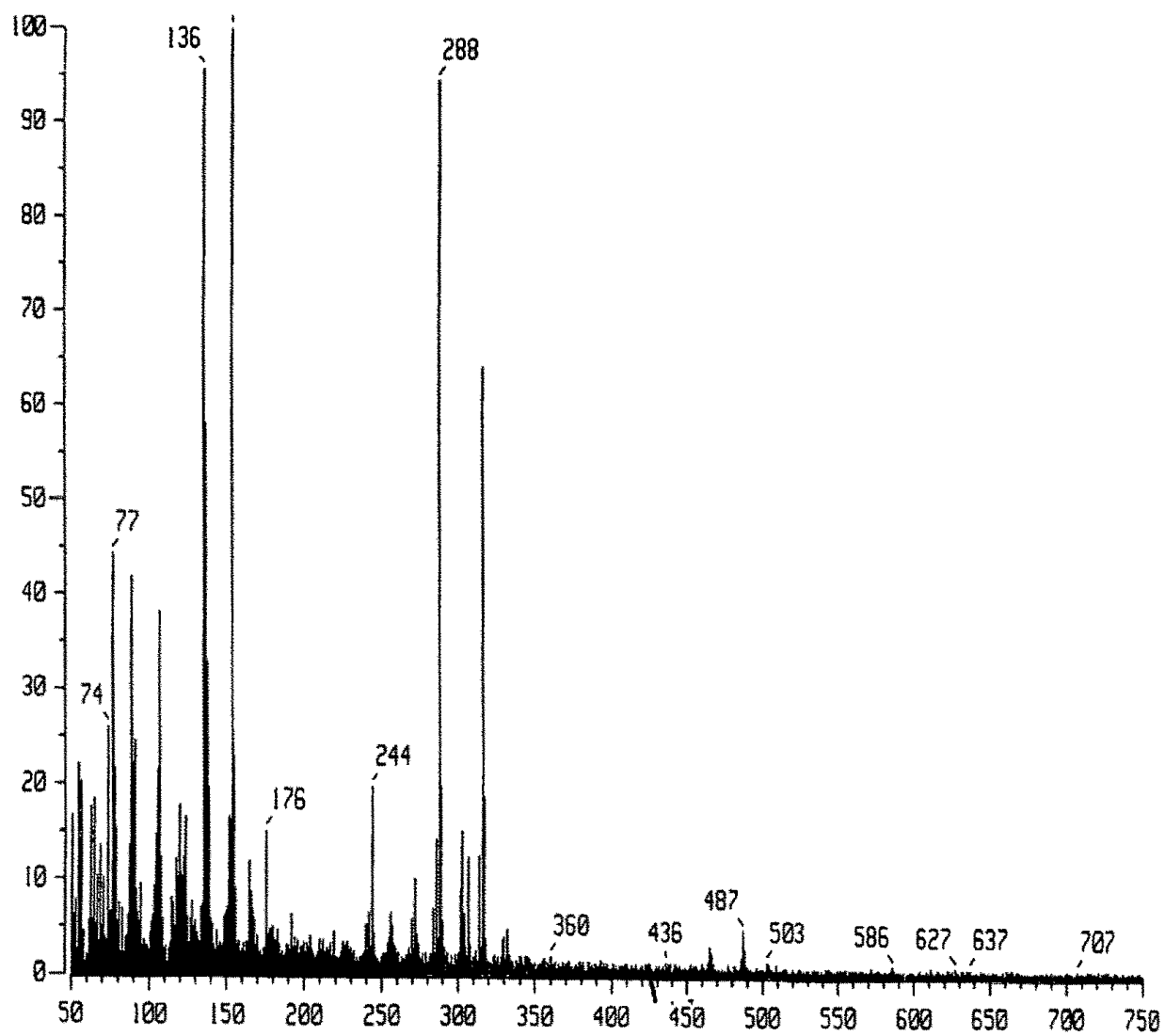


그림 17. EU-6의 FAB mass spectrum

eu-5

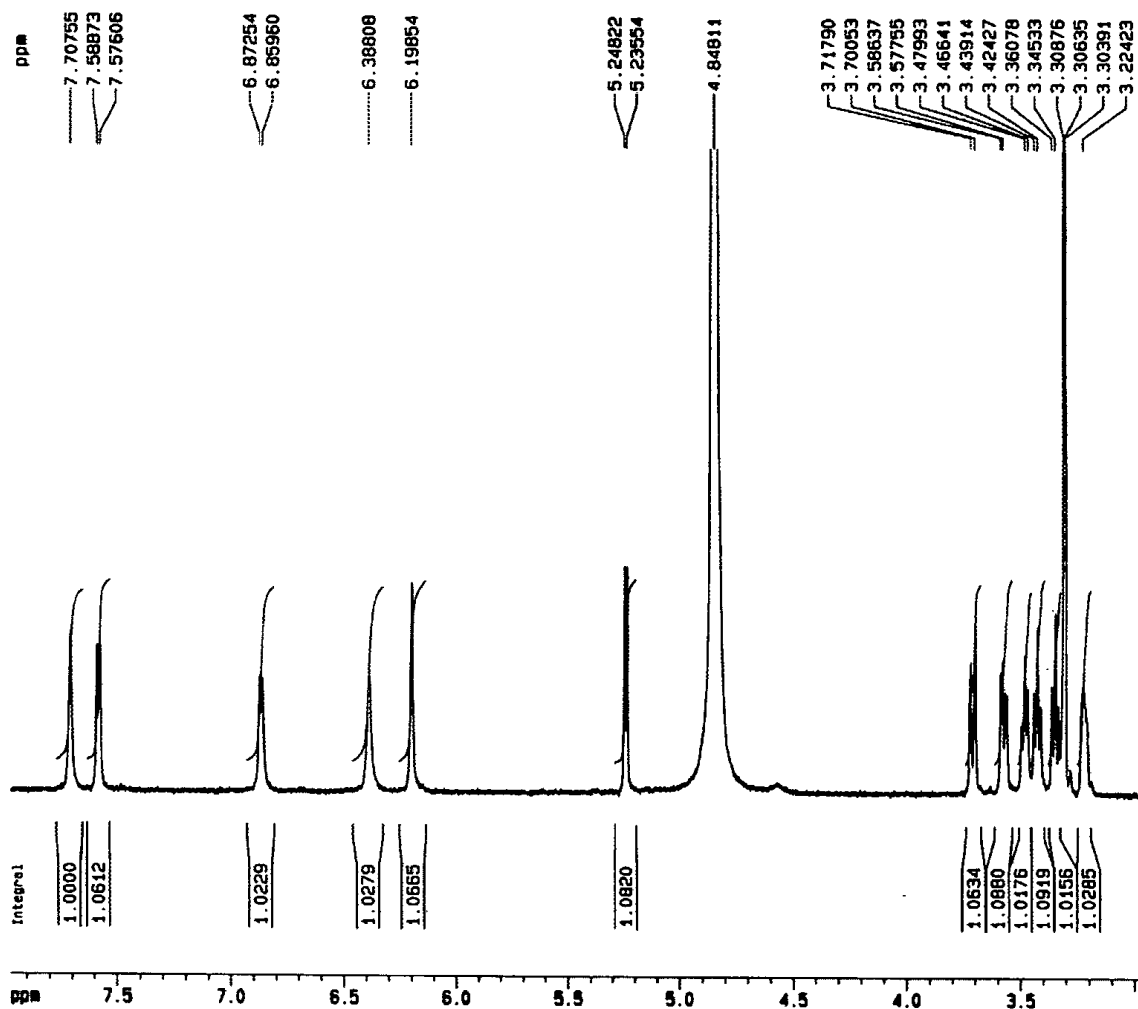


그림 18. EU-6의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum

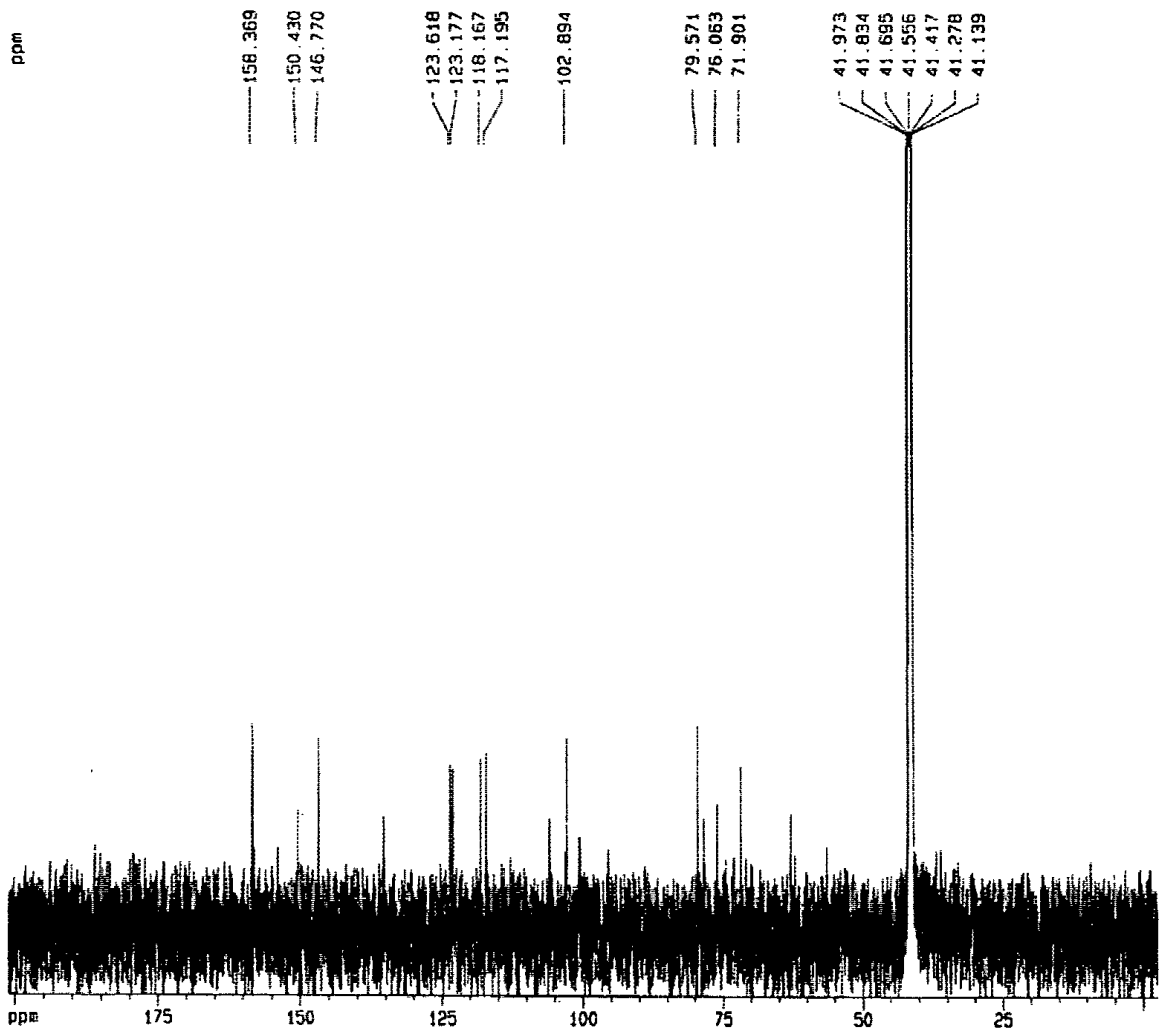


그림 19. EU-6의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum



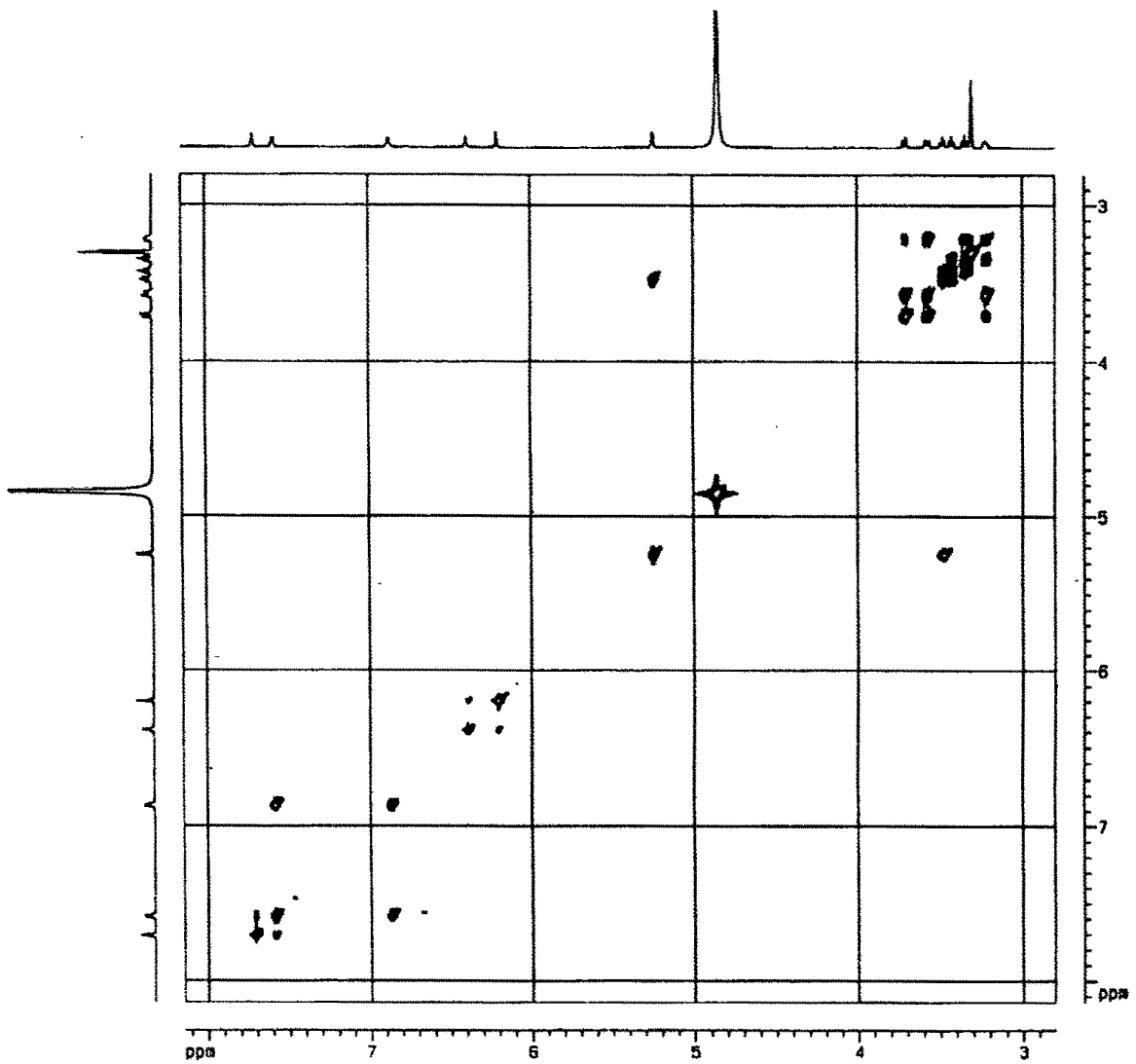


그림 20. EU-6의 COSY spectrum

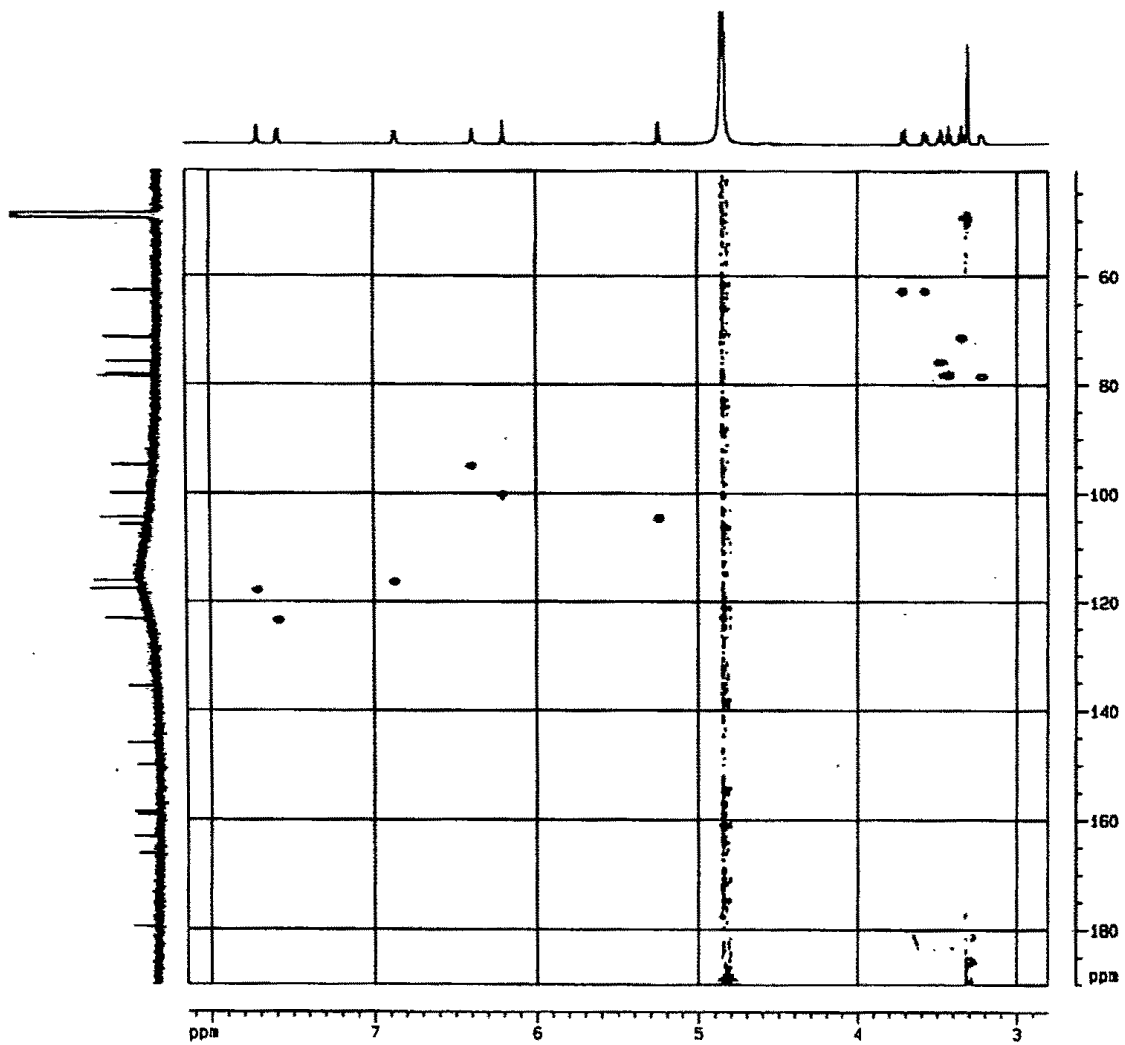


그림 21. EU-6의 HMQC spectrum

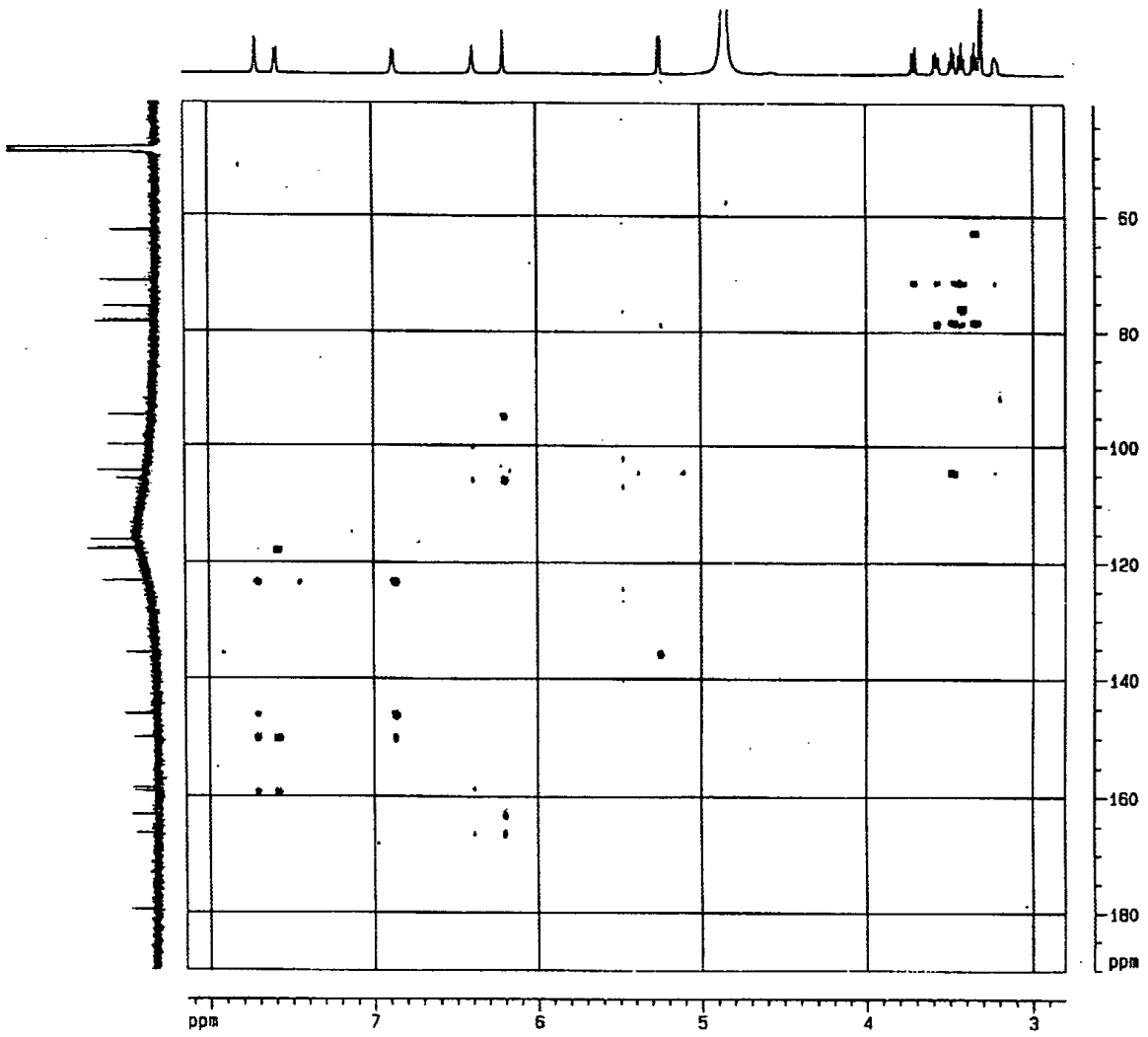


그림 22. EU-6의 HMBC spectrum

라. 시료 중의 당노조질 성분의 함량

두충나무의 산지별 부위별 시료 중의 EU-1, EU-4 및 EU-6의 함량을 분석하였다. 그 결과 이 화합물들을 최초로 분리한 원주산 두충엽 중의 함량이 각각 9.42, 2.54, 6.80 g/g dry weight로서 분석한 시료 중에서는 가장 높은 함량으로 존재하였다. 또한 산지가 다른 시료의 잎 중의 함량도 원주산보다는 낮지만 높은 편이었다. 가지, 수피, 열매, 순, 뿌리 등에도 고르게 존재하여 이 화합물들은 두충나무의 부위에 따라 보편적으로 존재함을 알 수 있었다 (표 14).

표 14. 두충나무 산지별 부위별 시료 중의 활성 물질의 함량 (mg/g dry weight)

Sample	Parts	EU-1	EU-4	EU-6
경남 하동	가지	0.85 ± 0.01	1.21 ± 0.01	2.11 ± 0.01
	껍질	2.00 ± 0.02	0.58 ± 0.01	2.45 ± 0.01
경북 의성	잎	8.44 ± 0.02	3.00 ± 0.02	4.34 ± 0.01
	가지	1.44 ± 0.01	0.99 ± 0.00	1.23 ± 0.00
	껍질	1.67 ± 0.01	0.64 ± 0.00	0.89 ± 0.00
충남 공주	잎	9.89 ± 0.03	1.66 ± 0.01	3.56 ± 0.01
	열매	7.00 ± 0.02	2.45 ± 0.01	5.33 ± 0.01
	껍질	1.22 ± 0.01	0.90 ± 0.01	2.10 ± 0.00
강원 원주	잎	9.42 ± 0.02	2.54 ± 0.01	6.80 ± 0.01
	껍질	1.00 ± 0.01	1.88 ± 0.01	2.45 ± 0.01
경기 수원	잎	8.66 ± 0.02	1.98 ± 0.02	5.77 ± 0.01
	가지	1.90 ± 0.01	0.99 ± 0.01	2.11 ± 0.01
	껍질	0.98 ± 0.00	0.54 ± 0.00	1.80 ± 0.00
	순	2.46 ± 0.01	1.54 ± 0.01	4.99 ± 0.01
	뿌리	1.42 ± 0.01	1.94 ± 0.01	2.43 ± 0.00

평균 ± 표준편차 (n=3)

## 제 4절 참고 문헌

Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa and S., Nishibe, S. The constituents of *Eucommia ulmoides* IV. Isolation of a new sesquilignan glycoside and iridoids. *Chem. Pharm. Bull.* 34:4933-4938(1986)

The Diabetes Control and Complication Trial Research Group: The effect of intensive insulin treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 329:977-986, 1993

Hong N. D., No, Y. S., Kim, J. W., studies on the general Pharmacological activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor J. Pharmacogn.* 18(2):112-117(1987)

Hu, S. Y., A Contribution to our Knowledge of Tu-Chung-*Eucommia ulmoides*. *American J. Chinese Med.* Vol. VII, No. 1, 5-37 (1978)

Hwang W. K., Choi, S. B. and Kim, I. H. Physiological activities of mixed

extracts of *Acantopancis senticosi* radices cortex and *Eucommiae* cortex. *Kor J. Pharmacogn.* 27(1) : 65-74(1996)

Kim, H. Y. Hypocholesterolemic and Hypotensive activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Food Industry and Nutrition.* 5(2): 27-28(2000)

Klein, R., Klein, B.E.K., Moss, S.E., Davis, M.D., DeMets, D.L.: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch. Ophthalmol.* 102:520-6, 1984

Klein, R., Klein, B.E.K., Moss, S.E., Davis, M.D., DeMets, D.L.: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is more than 30 years. *Arch. Ophthalmol.* 102:527-32, 1984

Lorenzi, M., Cagliero E., Toledo, S. Glucose toxicity for human endothelial cells in culture : delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated

death. *Diabetes* 34: 621-27, 1985

Metori, K., Furutsu, M. and Takahashi. S. the prevention effect of ginseng with Du-Zhung leaf on protein metabolism in aging. *Biol. Pharm. Bull.*, 20:237-242(1997)

Metori, K., Furutsu, M. and Takahashi. S. the prevention effect of ginseng with Du-Zhung leaf on protein metabolism in aging. *Biol. Pharm. Bull.*, 20:237-242(1997)

Naeser, P. Cell replication in retinal vessels of streptozocin diabetic mice. *Acta Ophthalmol* 64: 439-440, 1986

Nakamura, T., Nakazawa, Y., Onizuka, s., Satoh, S., Chiba, A., Seikashi, K., Yasugahara, N. and Sasaki, Y. Antimutagenicity of Tochu tea: 1. The clastogen-Suppressing effect of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mut. Res.*, 388:7-20(1997)

Nakasa, T., Yamaguchi, M., Okinaka, O. and Metori, K. Effects of Du-zhung leaf

extract on plasma and hepatic lipids in rats fed on a high fat plus high cholesterol diet. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 69, 1491-1498 (1995)

Oh, D. J., Park, M. H., Park, S. S., Yoon, J. H. and Cho, H. I. *The Korean Journal of Hematology*, 31(2) :225 -234 (1996)

Ohkubo, Y., Kishikawa, H., Araki, E., Miyata, T., Isami, S., Motoyoshi, S., Kojima, Y., Furuyoshi, N., Shichiri, M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 28(2): 103-17, 1995

Orlidge, A., D'Amore, P.A. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 105:1455-62, 1987

Sasaki, Y., Satoh, S., Chiba, A., Murakami, M., Sekihashi, K., Tanaka, M., Moribayashi, N., Kudou, C., Hara, Y., Nakazawa, Y., Nakamura, T. and Onizuka, O.: Antimutagenicity of Tochu tea: 2. Suppressing effect of tochu tea. *Mut. Res.*, 371, 203-214(1996)



Stout, R.W. Glucose inhibits replication of cultured human endothelial cells

Diabetologia 23: 436-9, 1982

## 제 3 장 두종의 생체내 당뇨조절 효과 연구

### 제 1절 서 론

시험관내에서의 실험에 의하여 혈당강하 및 당뇨합병증 억제 효과를 나타내는 소제는 생체내에서도 효과를 나타내리라고 예상되어진다. 그러나 in vitro 작용과 in vivo 효과는 반드시 일치하지는 않으므로 in vivo test에 의하여 그 효능을 확인하여야 한다. 인체를 대상으로 효능을 시험하는 것은 많은 문제를 안고 있으므로 실험 동물을 대상으로 효능을 시험하여 인체에 대한 기대치를 예상하고 있다.

실험 동물은 사람의 다양한 생명 현상을 이해하기 위하여 연구 목적에 맞게 육성 번식된 동물을 말한다. 이러한 실험 동물을 대상으로 동물에 일정한 실험 처치를 가하고 그 결과로 나타나는 동물의 생체 반응을 조사하여 그 결과를 토대로 사람에게 대한 기대치를 예상하는 것을 외삽 (extrapolation)이라 한다. 특히 사람의 특정 질환을 연구하기 위하여 자연적 혹은 인위적으로 특정 질환을 갖도록 개발된 동물을 질환 모델 동물 혹은 모델 동물이라고 한다. 질환 모델 동물은 사람을 대상으로 처치를 가하거나, 실험을 하거나 자료를 분석하기 어려운 질환을 대상으로 개발되어 왔으며 사람의 특정 질환과 병태 양상이 매우 흡사하며 동시에 일정한 차이점을 가지고 있다. 반드시 모델 동물과 사람 질환의 부분적 유사성을 이용하여 사람의 질환을 이해해야

하며, 실험 동물을 통하여 얻은 결과는 사람과 모델 동물 간의 여러 가지 차이점 등, 여러 요인을 고려하여 사람의 경우에 유추 해석하여야 한다.

당뇨병의 모델 동물로는 인위적 유발 모델과 자연적 발증 모델이 있으며, 최근 개발되어진 유전공학적 기법에 의한 transgenic, knock-out 모델 동물이 있다. 인위적 모델 동물은 췌장의 전부 혹은 일부를 절제하여 수술적으로 당뇨병을 유발하는 모델 동물, streptozotocin(STZ), alloxan, vacor, monosodium glutamate와 같은 화학 물질에 의하여 당뇨병을 유발하는 모델 동물과 EMC-D virus, Coxsackie B4 virus와 같은 beta cell tropic virus와 reovirus type 1과 같은 자가면역기전에 의하여 당뇨병을 유발하는 virus성 모델 동물이 있다. 자연 발증 모델 동물로는 랫드, 마우스, 기니 피크, 햄스터 등에서 다양한 모델 동물이 있으며, 개, 고양이, 원숭이류 등에서도 자연적으로 당뇨병이 발증된 예가 많이 보고되고 있다. 또한 인슐린 의존형, 인슐린 비 의존형 당뇨병형에 관한 모델 동물이 개발되어 있다. 또한 당뇨병 모델 동물간에도 당뇨병의 정상 및 원인, 결과에는 많은 차이를 보이고 있어 이 차이에 관한 이해가 절실히 요구되고 있다. 일례로 인슐린 요구량과 작용량의 함수 관계에 있어서 당뇨병 모델 동물 간에도 현격한 차이가 있어서 insulin clamp study 경우에 반드시 고려되어야 할 사항이 있다.

당뇨병성 만성 합병증은 대혈관증과 미세혈관 합병증으로 나뉜다. 대혈관증은 당뇨병이 특이적인 원인으로 작용하지는 않으나 흡연, 고혈압, 고지혈증과 더불어 당뇨

병이 위험 인자로 작용한다. 당뇨병성 미세혈관 합병증은 당뇨병성 신증, 당뇨병성 신경 질환, 당뇨병성 망막증을 의미한다. 이들 미세혈관 합병증은 당뇨병에 특이한 합병증으로 장기간의 hyperglycemia를 동반하지 않으면 발병하지 않으며 합병증의 진행 및 예후에 있어서 많은 환경적 유전적 요인이 관여하는 것으로 알려져 있다.

당뇨병성 합병증의 발병에는 당뇨병의 이환 기간, 혈당 조절이 매우 중요한 요인으로 당뇨병성 만성 합병증의 모델 동물을 사용하는 데에도 이 두 가지가 우선적으로 고려되어야 한다. 즉 적절한 당뇨병의 만성 합병증 모델 동물은 첫째 당뇨병 유병 기간이 랫드, 마우스 등에서는 적어도 3개월 이상은 8-11 개월까지 지속되어야 하며, 둘째 그 기간의 혈당조절이 실험동물의 폐사를 초래하지는 않을 만큼 적절한 고혈당으로 유지되어야 하는데, 주로 300-400 mg/dl가 적당하다. 그러기 위해서는 모델 동물의 장기간에 걸친 안정적인 사육과 정기적인 혈당, 인슐린, 뇨당의 모니터링이 무엇보다도 중요하다.

당뇨병성 합병증은 collagen IV의 증가, heparan sulfate proteoglycan의 감소에 따른 미세혈관 기저막의 비후 등의 형태학적 변화와 capillary permeability, blood flow, viscosity의 증가와 혈소판 기능 저하 등의 기능적 변화를 수반하여 각종 실질 장기에서 microthrombus 형성에 기여한다. 그러나 랫드, 마우스 등의 실험 동물에서는 혈청 지단백질의 변화에도 불구하고 당뇨병 발증에 따른 말초 조직의 미세혈관의 변화는 뚜렷하지 않다.

당뇨병성 신증은 만성 신증후군의 많은 수를 차지하는 주요 질환으로 단백뇨와 더불어 병리학적으로 mesangium의 뚜렷한 증식으로 nodular glomerulosclerosis (Kimmelstiel Wilson lesion)를 보이며 사구체 기저막의 비후를 보인다. 당뇨병성 신증은 랫드, 마우스, 기니픽, 햄스터, 개 등에서 보고가 있었으나 실험동물로 널리 사용되는 랫드, 마우스 등에서는 당뇨병의 이환기간이 상당히 진행되더라도 당뇨병 환자에서 특이적으로 관찰되는 nodular glomerulosclerosis는 보이지 않으며 PAS 혹은 PAM 염색에 특징적으로 관찰되는 membrane glomerulosclerosis를 보인다. 또한 랫드, 마우스 등의 설치류에서는 STZ으로 유발한 당뇨병에서 GFR의 증가를 손쉽게 관찰할 수 있다. 당뇨병성 신증의 발현에 유전적 요인이 관련있다는 여러 연구 결과가 있어 왔다. 유전적으로 관련된 연구 결과를 위해서는 유전적인 정보가 다른 실험 동물에 비하여 보다 상세하게 알려진 마우스를 선택하는 것이 유리하다.

당뇨병성 망막증은 당뇨병의 만성 합병증 중 가장 말기에 동반되는 것으로 실험 동물에서 당뇨병성 망막증을 재현하는 것은 쉬운 일은 아니다. STZ을 이용하여 랫드나 마우스에서 인슐린 의존형 당뇨병을 유발할 경우, 혈당량을 급격한 상승으로 인슐린 치료 없이 장기간 생존시키기가 매우 어려우며 매일 인슐린 처치를 해 주는 것 또한 쉽지 않은 일이다. 장기간 생존시키는 것이 가능한 WBN/Kob 랫드 등이 실험에 적합하며 실제로 8개월령 이상 12개월 전후의 당뇨병 발증 개체에서 당뇨병성 망막증에 의한 외견상 뚜렷한 안구 혼탁 등이 관찰된다. 또한 몸 크기가 다소 큰 랫드가 외과

.적인 처치가 쉬워서 마우스에 비하여 유리하다.

· 당뇨병성 신경병증은 hyperglycemia로 유발된 sorbitol의 축적, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity의 감소, 세포내 Na의 증가가 관련이 있다고 알려져 있다. STZ으로 당뇨병을 유발한 랫드와 WBN/Kob 랫드에서 sural nerve 및 sciatic nerve의 demyelination이 보고되어 있다.

당뇨병성 합병증을 연구하기 위한 모델 동물로는 장기간 사육이 가능한 랫드, 마우스, 햄스터 등이 적합하며 일반적으로 개, 고양이, 돼지 등은 부적합하다고 알려져 있다. 개, 고양이 등에 있어서 이환 기간이 오래된 개체에서 마우스, 랫드 등의 당뇨병 모델 동물에서 관찰되지 않는, 췌도의 amyloid 침착이 관찰되어 당뇨병 환자에서 관찰되는 것과 유사한 소견을 볼 수 있다는 장점이 있으나 사육 문제 및 당뇨병 유발에 따른 극심한 고통으로 개, 고양이 등의 동물을 이용한 실험은 동물 윤리 차원에서 도 외국에서도 배제되는 실정이다.

이상에서 살펴 본 바와 같이 혈당강하 작용의 생체내 실험은 실험 동물을 이용하여 용이하게 실험할 수 있으나, 당뇨병 합병증의 생체내 실험은 여러 가지 문제점을 안고 있다. 또한 실험실에서 동물 실험에 이용할 수 있을 정도의 두충나무 조추출물의 제조는 가능하지만, 두충나무로부터 단일 성분을 분리하여 사육 기간이 장기간이어야 하는 당뇨 합병증의 생체내 실험에 이용하기는 용이하지가 않았다.

본 연구에서는 두충나무의 조추출물의 혈당강하 및 당뇨합병증의 생체내 작용을

검증하였으며, 두충나무로부터 분리한 세 개의 성분도 생체내 혈당강하 작용 및 당뇨 합병증 억제 작용을 검증하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

두충나무의 산지별 부위별 시료의 *in vitro* 효능 검증에서 가장 효과가 높았던 원주산 잎의 50% methanol 추출물 및 이로부터 분리한 EU-1, EU-4 및 EU-6를 대상으로 하였다.

### 2. 연구 방법

#### 가. 혈당강하 효과

##### 1) 식후 혈당상승 억제 효과

두충 추출물 및 성분의 생체내 혈당 강하 효과는 ketosis가 없는 인슐린 비의존형 당뇨 모델 동물인 Zucker fa/fa rat 및 lean littermate을 사용하였다. 식후 혈당반응(postprandial blood response)를 측정하였으며 탄수화물을 일정량 실험동물에 부하한 후 2시간 동안 30분 간격으로 혈액을 채취하여 혈당치를 분석하여 각 시간에서

의 분석치와 glucose response curve 아래의 면적을 비교하였다.

## 2) 장기간의 혈당조절 효과

두충 추출물의 장기간의 혈당조절 효과는 ketosis가 없는 인슐린 비의존형 당뇨병 모델 동물인 C57BL6/J-Lep<sup>db</sup> (ob/ob) 및 C57BL6/J-Lep<sup>db</sup> (ob/?) mice를 사용하여 검증하였다. 즉 ob/ob mice의 식이(표 15)에 1.5%(w/w)로 혼합된 두충 추출물을 8주간 투여하였을 때의 혈당조절 효과를 살펴보았다. Ob/ob mice는 인슐린 저항성, 식욕 증진, 고인슐린 혈증, 고혈당, 고지혈증, 체온 조절의 이상, 갈색 지방조직의 이상의 특징을 가진다.

표 15. 실험 식이의 조성 (g/kg diet)

Ingredients	Control diet	Eucommia leaf diet
Eucommia leaf extract	0	15
Corn starch	450	435
Sucrose	200	200
Casein	200	200
Cellulose	50	50
Vitamin mixture	10	10
Mineral mixture	35	35
DL-Methionine	3	3
Choline bitartrate	2	2



## 나. 두충의 당뇨합병증 억제 효과

### 1) 두충 추출물의 당뇨합병증 억제 효과

인슐린 비의존형 당뇨 모델 동물인 ob/ob mice의 식이에 두충추출물을 1.5%(w/w)로 첨가하여 8주간 사육한 후 조직 중의 당뇨합병증 발병 지표를 분석하였다.

### 2) 두충으로부터 분리한 성분의 당뇨합병증 억제 효과

인슐린 비의존형 당뇨 모델 동물인 ob/ob mice에게 두충 추출물을 50mg/kg BW/day의 용량으로 8주간 경구 투여 후 8주간 사육한 후 조직 중의 당뇨합병증 발병 지표를 분석하였다.

## 제 3절 결과 및 고찰

### 1. 두충의 생체내 혈당강하 작용

#### 가. 두충의 식후 혈당상승 억제 작용

##### 1) 두충엽 추출물의 식후 혈당상승 억제 작용

##### 가) S.D.rat에서의 혈당상승 억제 작용

Sprague Dawley 수컷쥐(5주령)를 이용하여 전분 1.0g/kg의 부하에 의한 혈당 상승에 미치는 두충엽 50% methanol 추출물의 효과를 검증하였다. 전분 1.0g/kg과 함께

추출물 50mg/kg BW을 투여한 후 0, 0.5, 1, 2시간의 혈당치를 분석하였다. 각 시간의 혈당치와 0 시간과의 차이를 구하여 대조군과 비교한 결과 측정된 모든 시간에서 유의적인 ( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다 (표 16).

두충엽 투여 후 0시간에서 2시간까지의 혈당치 변화를 그린 후 baseline 위의 면적(area under the curve)을 구하였을 때 두충엽 투여군은 대조군에 비하여 23%의 유의적인( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다(표 17). 이상의 결과로부터 두충엽의 50% methanol 추출물에 의한 생체내 혈당상승 억제효과를 확인하였다.

표 16. 두충엽 투여가 S.D. rat에서 전분 부하 후 혈당치 변화에 미치는 영향

실험군	체중 g	용량 mg/kg	0.5hr <sup>1</sup> mg/100ml	1hr mg/100ml	2hr mg/100ml
대조군	150.2 ± 8.69	-	66.60 ± 8.56	50.16 ± 9.49	38.51 ± 4.47
두충엽	152.6 ± 5.48	50	54.22 ± 7.91*	42.97 ± 5.65*	20.15 ± 5.17*

Results are expressed as mean ± SEM of 5 rats per group.

<sup>1</sup>Difference of plasma glucose from 0 hr value after starch ingestion.

\*Significantly different from the control group by Student's t-test at  $p < 0.05$ .

표 17. 두충엽 투여가 S.D. rat에서 전분 부하 후 'Area under the curve'에 미치는 영향

실험군	용량 mg/kg	AUC <sup>1</sup> mg/100ml · hr	Percent inhibition %
대조군	-	90.18 ± 9.61	-
두충엽	50	69.41 ± 9.82*	23

Results are expressed as mean ± SEM of 5 rats per group.

<sup>1</sup>Area under 0-hr to 2-hr glycemic response curve.

\*Significantly different from the control group by Student's t-test at p < 0.05

나) Zucker rat에서의 혈당상승 억제 작용

인슐린 비의존형 당뇨병 모델 동물인 Zucker fa/fa rat와 이의 정상적인 lean littermates를 이용하여 두충잎의 50% methanol 추출물의 식후 혈당 상승 억제 작용을 확인하였다. 수용성 전분 2 g/kg body weight 부하 전후의 혈당치 상승분을 구하여 대조군과 비교한 결과 lean littermates 및 fa/fa rats 모두에서 유의적인(P < 0.05) 저하를 보였으며, fa/fa rats는 lean littermates에 비하여 더 높은 저해 효과를 보였다. Area under the curve (AUC)는 두충잎 투여군은 대조군에 비하여 lean

littermates는 23%, fa/fa rats는 49%의 유의적인( $P < 0.05$ ) 저하를 보였다 (표 8, 표 9).

Zucker fa/fa rat 및 lean littermates을 이용하여 두충잎 50% methanol 추출물의 식후 혈당 상승 억제 효과를 확인하였다. 전분 2.0 g/kg과 함께 두충잎 추출물 50 mg/kg을 투여한 후 0, 0.5, 1, 2시간의 혈당치를 분석하였다. 각 시간의 혈당치와 0 시간과의 차이를 구하여 대조군과 비교한 결과 lean littermate 및 fa/fa rat 모두에서 유의적인( $P < 0.05$ ) 감소를 보였으며, fa/fa rat에서 억제 정도가 더 높았다.

두충잎 추출물 투여 후 0시간에서 2시간까지의 혈당치 변화를 그린 후 baseline 위의 면적(area under the curve)을 구하였을 때 두충잎 투여군은 대조군에 비하여 lean strain은 23%, fa strain은 49%의 유의적인( $P < 0.05$ ) 감소를 보였다. 이상의 결과로부터 두충잎의 50% methanol 추출물은 생체내에서 혈당상승 억제 효과가 있으며 당뇨 모델 동물에서 그 효과가 더 높음을 확인하였다.

표 18. 두충잎 투여가 Zucker rat에서 전분 부하 후 혈당치 상승에 미치는 영향

실험군	체중 g	용량 mg/kg	0.5hr <sup>1</sup> mg/100ml	1hr mg/100ml	2hr mg/100ml
Zucker lean					
대조군	150.2±8.69	-	66.60±8.56	50.16±9.49	38.51±4.47
두충엽	152.6±5.48	50	54.22±7.91*	42.97±5.65*	20.15±5.17*
Zucker fa/fa					
대조군	200.2±7.59	-	109.3±7.56	120.5±10.1	100.9±9.11
두충엽	202.6±8.00	50	88.22±7.00*	90.1±6.98*	70.25±4.17*

Results are expressed as mean±SEM of 5 rats per group.

<sup>1</sup>Difference of plasma glucose from 0 hr value after starch ingestion.

\*Significantly different from the control group by Student's t-test at p<0.05.

표 19. 두충잎 투여가 Zucker rat에서 전분 부하 후 'Area under the curve'에 미치는 영향

실험군	용량 mg/kg	AUC <sup>1</sup> mg/100ml · hr	Percent inhibition %
Zucker lean			
대조군	-	90.18±9.61	-
두충엽	50	69.41±9.82*	23
Zucker fa/fa			
대조군	-	250.8±10.5	-
두충엽	50	127.9±11.2*	49

Results are expressed as mean±SEM of 5 rats per group.

<sup>1</sup>Area under 0-hr to 2-hr glycemic response curve.

\*Significantly different from the control group by Student's t-test at p<0.05.

## 2) 두충으로부터 분리한 성분의 식후 혈당상승 억제 작용

Zucker fa/fa rat 및 lean littermates를 이용하여 두충잎으로부터 분리한 EU-1, EU-4 및 EU-6에 의한 식후 혈당 상승 억제 효과를 확인하였다. Lean littermates 및 fa/fa rats 모두에서 각 시간의 혈당치는 유의적인(P<0.01, P<0.05) 감소를 보였으

며 각 시간의 혈당치 증가량은 lean littermate 보다 fa/fa rat에서 훨씬 현저하였다 (표 9). 즉 전분 2.0 g/kg BW과 함께 각 화합물 및 알려진 혈당강하제인 acarbose를 5 mg/kg씩 투여한 후 0, 0.5, 1, 2시간의 혈당치를 분석하였다. 각 시간의 혈당치와 화합물 투여 전 혈당치 사이의 차이를 구하여 대조군과 비교한 결과 lean littermate 및 fa/fa rat 모두에서 유의적인 저하를 보였다. Lean littermates에 있어서 area under the curve는 EU-1, EU-4 및 EU-6은 대조군에 비하여 각각 35, 29, 26% 유의적으로 저하시켜서 acarbose의 23% 보다 높은 효과를 보였다. Fa/fa rats에서 Eu-1, EU-4 및 EU-6는 각각 55, 50, 45% 저하시켜서 acarbose의 40%에 비하여 높았다 (표 11).

표 20. 두층엽으로부터 분리한 성분이 전분 부하 후 혈당치 상승에 미치는 영향

실험군	체중 g	용량 mg/kg	0.5hr <sup>1</sup> mg/100ml	1hr mg/100ml	2hr mg/100ml
Zucker lean					
대조군	160.1±7.11	-	70.10±8.20	60.11±6.20	45.52±5.10
EU-1	159.4±5.34	5	44.02±3.91**	32.44±6.15**	30.05±4.07**
EU-4	162.6±4.90	5	50.32±7.93*	40.87±5.00*	35.65±6.17*
EU-6	160.1±3.97	5	53.00±8.63*	45.04±5.10*	37.75±5.17*
Acarbose	160.0±5.00	5	53.22±6.88*	45.66±6.25*	40.33±5.07*
Zucker fa/fa					
대조군	230.2±9.59	-	149.3 ±8.16	150.5±10.1	100.9 ±8.00
EU-1	228.6±7.00	5	78.12±9.10**	92.50±5.88**	68.05±5.17**
EU-4	231.1±6.34	5	83.50±6.93**	99.33±7.05**	77.50±7.33**
EU-6	229.2±5.14	5	86.20±7.93**	100.03±8.05**	78.40±6.03**
Acarbose	232.5±6.40	5	94.22±7.91**	112.97±6.60**	80.25±7.00**

Results are expressed as mean±SEM of 5 rats per group.

<sup>1</sup>Difference of plasma glucose from 0 hr value after starch ingestion.

\*Significantly different from the control group by Student's t-test at p<0.05.

\*\*Significantly different from the control group by Student's t-test at p<0.01.



표 21. 두층으로부터 분리한 성분이 'Area under the curve'에 미치는 영향

실험군	용량 mg/kg	AUC <sup>1</sup> mg/100ml · hr	Percent inhibition %
Zucker lean			
대조군	-	100.8 ± 7.66	-
EU-1	5	65.23 ± 8.80**	35.3
EU-4	5	71.40 ± 7.73**	29.2
EU-6	5	73.40 ± 6.93**	26.1
Acarbose	5	78.00 ± 5.55**	22.6
Zucker fa/fa			
대조군	-	299.8 ± 11.2	-
EU-1	5	135.4 ± 10.2**	54.8
EU-4	5	150.3 ± 9.34**	49.9
EU-6	5	147.3 ± 8.24**	45.4
Acarbose	5	180.9 ± 8.78**	39.7

Results are expressed as mean ± SEM of 5 rats per group.

<sup>1</sup>Area under 0-hr to 2-hr glycemic response curve.

## 나. 두층의 당뇨합병증 억제 효과

### 1) 두층 추출물의 당뇨합병증 억제 효과

Ob/ob mice (인슐린 비의존형 당뇨 모델 동물) 및 lean littermate (정상 동물; 수컷, 5주령)을 이용하여 두층의 산지별 부위별 *in vitro* 당뇨합병증 저해 효과 검색에서 가장 높은 효과를 보였던 원주산 잎을 대상으로 *in vivo* 효과를 검증하였다. 두층엽을 50% methanol로 추출하여 그 여과액을 감압 농축한 추출물을 제조하여, 추출물을 15 g/kg diet의 농도로 식이에 혼합하여 8주간 섭취시킨 후 당뇨 합병증 억제에 미치는 영향을 검증하였다. 두층 추출물의 섭취로 인한 실험군간의 체중, 식이섭취량, 간 중량의 유의적인 차이는 없었으며 신장 중량(g/100g 체중)은 두층 추출물 투여시 유의적으로 감소하였다 (표 22, 표 23).

표 22. 두층 추출물 투여쥐의 체중 변화

	Initial BW (g)	Final BW (g)	Weight gain (g/21 days)
Lean-control	32.82±1.82	39.45±3.05	0.30±0.12
Lean-experimental	32.88±1.77	39.64±2.04	0.34±0.10
ob/ob-control	61.52±3.56	64.08±3.62	0.12±0.08
ob/ob-experimental	61.47±3.74	63.91±4.08	0.13±0.07

Mean±SD (n=9-10)

표 23. 두층 추출물 투여가 ob/ob mice의 식이 섭취량 및 장기 무게에 미치는 영향

	Ob/ob mice		Lean littermate	
	Control	Eucommia	Control	Eucommia
	g/day			
Food intake	3.85±0.29	4.01±0.27	3.64±0.18	3.36±0.21
Extract intake		0.20±0.01		0.17±0.01
Leaf intake		0.67±0.04		0.56±0.03
	g/100g of body weight			
Liver weight	7.60±0.78	7.13±0.60	4.14±0.45	3.97±0.57
Kidney weight	0.82±0.06	0.70±0.13*	1.17±0.11	1.23±0.12

Mean±SD(n=9-10) \* p<0.05 \*\* p<0.01

혈액 중의 GHb는 당뇨합병증이 발병할 수 있는 가능성을 제시하는 지표이다. 본 연구에서는 정상쥐에서는 두충잎 투여가 GHb 함량에는 영향을 주지 않았으나 ob/ob mice에서는 두충잎 투여군은 대조군에 비하여 GHb 함량이 66% 감소하였다 (표 24).

표 24. 두충잎 투여가 ob/ob mice의 GHb 함량에 미치는 영향

실험군	용량 g extract/kg diet	Glycosylated Hemoglobin % of total hemoglobin
ob/ob lean		
대조군	-	0.50 ±0.06
두충잎	15	0.51 ±0.80
ob/ob ob		
대조군	-	3.27±0.23
두충잎	15	1.12±0.28*

Results are expressed as mean±SEM of 5 rats per group.

\*Significantly different from the control group by Student's t-test at p<0.05.

안구 수정체의 단백질인 crystallin은 체내 조직 단백질 중 turnover가 거의 일어

나지 않기 때문에 한 번 손상되면 그 영향을 회복할 수 없어서 치명적인 당뇨합병증을 초래한다. 본 연구에서 정상쥐에서는 두충잎 투여가 crystallin의 변화에 영향을 주지 않았으나 ob/ob mice에서는 두충잎 투여군은 대조군에 비하여 water-soluble fraction은 41%, urea-soluble fraction은 52% 감소하였다 (표 25).

표 25. 두충잎 투여가 안구 수정체 단백질의 변화에 미치는 영향

실험군	용량 g extract/kg diet	Percentage (%)	
		Water-soluble	Urea-soluble
ob/ob lean			
대조군	-	1.76 ±0.09	2.76 ±0.07
두충잎	15	1.98 ±0.80	1.99 ±0.09
ob/ob ob			
대조군	-	5.29±0.06	7.00 ±0.10
두충잎	15	3.12±0.28*	3.33 ±0.01*

Results are expressed as mean±SEM of 5 rats per group.

\*Significantly different from the control group by Student's t-test at p<0.05.

아울러 두층 추출물 투여군은 대조군에 비하여 ob/ob mice의 혈중 콜레스테롤치를 20%, 중성 지방 농도를 13% 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 저하시켰다. 간의 콜레스테롤치는 15%, 중성 지방 함량은 10% 유의적으로 저하시켰다 (표 26).

표 26. 두층 추출물의 투여가 ob/ob mice의 혈장 콜레스테롤, 중성 지방,  $\beta$ -hydroxybutyrate, lactate 함량에 미치는 영향

	Ob/ob mice		Lean mice	
	Control	Eucommia	Control	Eucommia
Cholesterol (mg/dl)	425.36 ± 36.18	392.02 ± 54.11	259.57 ± 47.29	278.68 ± 19.43
TG (mg/dl)	157.28 ± 22.09	150.65 ± 24.74	103.93 ± 15.08	101.60 ± 18.92
$\beta$ -HBA (mg/dl)	4.22 ± 1.39	2.16 ± 0.75**	6.03 ± 3.31	6.14 ± 2.10
Lactate (mg/dl)	232.70 ± 2392	198.22 ± 13.90**	253.56 ± 39.28	195.07 ± 25.83**

Mean ± SD (n=9-10); \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$

## 2) 두층으로부터 분리한 성분의 당뇨합병증 억제 효과

두층잎에서 분리한 EU-1, EU-4 및 EU-6의 생체내 당뇨합병증 억제 효과를 확인하였다. Ob/ob mice 및 lean littermate에게 이 성분들을 각각 50 mg/kg BW/day의 용량으로 6주간 경구 투여한 후 조직에 미치는 영향을 검증하였다. 그 결과

정상쥐에서는 이 성분들의 투여가 GHb의 함량에 영향을 주지 않았으나 ob/ob mice에서는 이 세 성분 투여군은 GHb 함량을 감소시키는 효과가 확인되었다 (표 27).

표 27. EU-1, EU-4 및 EU-6의 투여가 GHb 함량에 미치는 영향

실험군	용량 mg/kg/day	GHb 함량 % of total
ob/ob lean littermate		
대조군	-	0.50 ±0.06
EU-1	50	0.52 ±0.80
EU-4	50	0.56 ±0.70
EU-6	50	0.48 ±0.15
ob/ob mice		
대조군	-	4.37 ±0.29
EU-1	50	1.13 ±0.18*
EU-4	50	2.51 ±0.90*
EU-6	50	2.80 ±0.70*

Results are expressed as mean±SEM of 5 rats per group.

\*Significantly different from the control group by Student's t-test at p<0.05.

EU-1, EU-4 및 EU-6의 투여는 정상쥐에서는 crystallin의 변화에 영향을 주지 않았으나 ob/ob mice에서는 대조군에 비하여 water-soluble fraction 및 urea-soluble fraction의 유의적인 변화를 초래하였다 (표 18).

표 28. EU-1, EU-4 및 EU-6의 투여가 crystallin의 변화에 미치는 영향

실험군	용량 mg/kg/day	Percentage (%)	
		Water-soluble	Urea-soluble
ob/ob lean			
대조군	-	1.99 ±0.09	2.31 ±0.08
EU-1	50	2.01 ±0.10	1.98 ±0.09
EU-4	50	1.78 ±0.10	2.00 ±0.10
EU-6	50	1.08 ±0.09	2.02 ±0.10
ob/ob ob			
대조군	-	6.29 ±0.06	6.98 ±0.11
EU-1	50	3.12 ±0.28*	4.23 ±0.11*
EU-4	50	5.11 ±0.20*	5.98 ±0.09*
EU-6	50	4.88 ±0.10*	4.88 ±0.09*

Results are expressed as mean±SEM of 5 rats per group.

\*Significantly different from the control group by Student's t-test at p<0.05.

## 제 4절 참고 문헌

The Diabetes Control and Complication Trial Research Group: The effect of intensive insulin treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 329:977-986, 1993



Hong N. D., No, Y. S., Kim, J. W., studies on the general Pharmacological activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor J. Pharmacogn.* 18(2):112-117(1987)

Hu, S. Y., A Contribution to our Knowledge of Tu-Chung-*Eucommia ulmoides*. *American J. Chinese Med.* Vol. VII, No. 1, 5-37 (1978)

Hwang W. K., Choi, S. B. and Kim, I. H. Physiological activities of mixed extracts of *Acanthopanax senticosi* radice cortex and *Eucommiae* cortex. *Kor J. Pharmacogn.* 27(1) : 65-74(1996)

Kim, H. Y. Hypocholesterolemic and Hypotensive activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Food Industry and Nutrition.* 5(2): 27-28(2000)

Klein, R., Klein, B.E.K., Moss, S.E., Davis, M.D., DeMets, D.L.: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch. Ophthalmol.* 102:520-6, 1984

Klein, R., Klein, B.E.K., Moss, S.E., Davis, M.D., DeMets, D.L.: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is more than 30 years. *Arch. Ophthalmol.* 102:527-32, 1984

Lorenzi, M., Cagliero E., Toledo, S. Glucose toxicity for human endothelial cells in culture : delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. *Diabetes* 34: 621-27, 1985

Metori, K., Furutsu, M. and Takahashi. S. the prevention effect of ginseng with Du-Zhung leaf on protein metabolism in aging. *Biol. Pharm. Bull.*, 20:237-242(1997)

Naeser, P. Cell replication in retinal vessels of streptozocin diabetic mice. *Acta Ophthalmol* 64: 439-440, 1986

Nakamura, T., Nakazawa, Y., Onizuka, s., Satoh, S., Chiba, A., Seikashi, K., Yasugahara, N. and Sasaki, Y. Antimutagenicity of Tochu tea: 1. The

clastogen-Suppressing effect of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mut. Res.*,  
388:7-20(1997)

Nakasa, T., Yamaguchi, M., Okinaka, O. and Metori, K. Effects of Du-zhung leaf  
extract on plasma and hepatic lipids in rats fed on a high fat plus high  
cholesterol diet. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 69, 1491-1498 (1995)

Oh, D. J., Park, M. H., Park, S. S., Yoon, J. H. and Cho, H. I. *The Korean  
Journal of Hematology*, 31(2) :225 -234 (1996)

Ohkubo, Y., Kishikawa, H., Araki, E., Miyata, T., Isami, S., Motoyoshi, S.,  
Kojima, Y., Furuyoshi, N., Shichiri, M. Intensive insulin therapy prevents the  
progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with  
non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study.  
*Diabetes Res. Clin. Pract.* 28(2): 103-117, 1995

Orlidge, A., D'Amore, P.A. Inhibition of capillary endothelial cell growth by  
pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 105:1455-62, 1987

Sasaki, Y., Satoh, S., Chiba, A., Murakami, M., Sekihashi, K., Tanaka, M.,

Moribayashi, N., Kudou, C., Hara, Y., Nakazawa, Y., Nakamura, T. and Onizuka  
O.: Antimutagenicity of Tochu tea: 2. Suppressing effect of tochu tea. Mut  
Res., 371, 203-214(1996)

# 제 4 장 두층을 이용한 당노조절 소재 생산 가공 공정 연구

## 제 1절 서 론

본 연구에서는 두층으로부터 당노조절 식품소재를 제조하기 위하여 추출, 분리·농축, 건조 공정을 수행함에 있어서 관여하는 공정변수를 조사하고 제조 공정을 확립하고자 하였다. 그 중 가장 핵심적인 공정은 추출과 분리·농축이라 할 수 있으며 분리·농축공정에는 비열처리 공정인 막분리공정을 적용하고자 하였다. 이들 핵심공정의 기본원리와 관련 공정변수 및 적용 예를 살펴보면 다음과 같다.

### 1. 추출

추출(extraction)은 액체 또는 고체원료 중에 포함되어 있는 유용한 가용성 성분을 용매에 녹여 분리하는 조작이다. 추출조작은 식물로부터 유효성분을 분리하여 식품 및 의약품을 만들거나 발효액으로부터 발효식품 및 생물공학제품의 제조공정, 유량중에서 식용유를 제조하는 공정에 이용되고 있다.

추출조작은 원료가 용매와 접촉하여 추재 내에 있는 용질이 용매 속으로 이동되는

일종의 물질이동조작(mass transfer operation)이다. 이때 물질이동속도(mass transfer rate)는 원료와 용매 사이의 농도차의 크기에 비례하게 되며, 용질이 고-액의 2개의 상 사이에서 평형상태에 도달하면 용질의 이동은 일어나지 않는다. 이렇게 추출은 평형상태와 밀접한 관계가 있기 때문에 용매와 원료를 효과적으로 접촉시켜 평형에 도달하게 하여 유효성분을 분리하는 접촉평형분리조작(contact equilibrium separation)이라고 요약할 수 있다<sup>1)</sup>.

#### 가. 추출을 위한 추재의 전처리

전처리 방법은 고체의 성질이나 용질의 함량과 분포 등에 따라 달라진다. 용질이 비용해성 물질로 둘러싸여 있는 경우에는 분쇄하여 용질이 용매와 쉽게 접촉할 수 있도록 함으로써 추출속도를 증가시킬 수 있다. 생체원료는 세포조직으로 구성되며, 대부분의 경우 용질은 세포 내에 존재하므로 용질이 세포막을 투과할 때 확산저항을 받아 추출속도가 느리다. 예를들면 사탕무와 같은 경우, 얇게 자르면 용매인 물이 각 세포까지 확산 도달하기 쉬워 추출효과가 상승하게 된다. 또한 식물의 잎, 뿌리, 줄기 등에서 의약품을 추출하는 경우, 원료를 추출하기 전에 건조시킨 다음 세포벽을 파열시켜 용질이 직접 용매에 용해되도록 해준다. 콩과 기타 식품씨앗 등은 몇 조각으로 분쇄한 다음 0.1mm~0.5mm 정도로 얇게 압착하여 세포벽을 파열시켜 용매가 내부의 기름과 쉽게 접촉할 수 있게 한다<sup>2)</sup>.

## 나. 추출속도

고체-액체 추출조작에서 가장 중요한 문제는 추출속도에 영향을 미치는 인자와 원료로부터 가용성 성분을 가능한 완전히 추출하는 동시에 고농도의 추출액을 얻는 방법이다. 고체 내부의 가용성 성분을 용매로 추출하는 과정은 다음의 3가지 단계로 진행된다. (1) 먼저 용매가 고체 내부로 침투하여 가용성 성분을 녹인다. (2) 용해된 물질은 농도차에 의하여 고체내부에서 표면으로 확산한다. (3) 고체표면에서 액체필름을 통하여 용매로 확산된다. 일반적으로 위의 단계 중 (1)단계와 (3)단계는 빠르다. 그러므로 많은 경우 내부확산에 의한 가용성 성분의 이동속도가 침출공정에서 속도제한 단계(rate limiting step)가 된다. 용해된 용질이 고체 내부에서 표면으로 확산하는 속도는 여러 가지 인자에 의하여 좌우된다.

## 2. 막분리

분리 공정(separation process)이란 기본적으로 분리대상 물질의 크기 차이를 이용하여 액상 혹은 기체상의 혼합물로부터 둘 혹은 그 이상의 물질들을 나누는 공정을 지칭한다. 막분리 공정을 증발 농축(evaporation) 공정과 비교하였을 때 갖는 특징과 장점은 다음과 같다. i) 상변화 없이 연속분리가 가능하다. ii) 펌프 작동에 필요한 전기적 에너지만 필요하다. iii) 증발농축기를 운용하는 데는 응축기가 필수 부품

이며, 응축기 운용에는 상당량의 냉각수가 필요한데 막분리공정에서는 응축기를 필요로 하지 않는다. iv) 실온에서 운용 가능하며 제품품질향상을 기할 수 있다<sup>3)</sup>.

막분리 공정은 사용하는 막의 pore size에 따라 microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, reverse osmosis로 대별될 수 있으며 각 공정에서의 적용대상도 달라지게 된다.

#### 가. 미세여과 공정 (microfiltration)

Microfiltration (MF)는 입자가 적은 물질로부터 수 $\mu\text{m}$ 정도의 콜로이드성 물질의 분리에 사용되는 공정을 말한다. 막분리공정 중에서 정밀 여과막의 세공의 크기가 비교적 큰 편에 속하여 주로 분자 크기에 의해 선택적 분리를 위해 사용하고 있다. MF는 분자량 200,000dalton 이상의 물질들을 선택적으로 분리하는데 유효한 공정으로서 미세여과막에 의하여 분리 가능한 용질의 크기는 0.1~10 $\mu\text{m}$  정도이며, 대개의 미세여과막의 pore size는 0.01~10 $\mu\text{m}$ 이다. MF 공정의 분리효과는 근본적으로 분리 대상 물질과 막의 pore size에 의해서 결정된다. 그러나 막의 pore size보다 작은 물질들이 전부 막을 통과하는 것은 아니고 분리 대상물질이 막에 흡착되거나 pore 부근에서 입체적 장애 현상이 발생하면 pore size보다 작은 물질들도 막을 통과하는데 제한을 받게 된다. 일반적으로 MF 공정운용상의 가장 큰 문제점은 콜로이드성 입자에 의한 막침착 현상을 들 수 있다. MF에 적절한 막세공의 용적은 막 총부피의 80%가 적



절한 것으로 알려져 있다. MF 시스템에서 분리대상으로 하는 용액 중에는  $5.0\mu\text{m}$  이하의 작은 콜로이드성 입자들이 들어 있어서 표면전기 인력이 콜로이드의 응집속도와 분리막내에서의 확산 속도에 영향을 준다. 일반적으로 막표면에서의 흡착은 i) 용착 (deposition), ii) 부착(adhesion), iii) 흡착(adsorption)현상으로 세분할 수 있으며, MF 공정에서 주된 분리 대상인 콜로이드성 입자는 MF막에 용착을, 단백질은 막에 흡착을 주로 야기시키는 것으로 알려져 있다. MF 공정의 막횡단압력은 reverse osmosis (RO)나 nanofiltration (NF) 공정보다 훨씬 낮아서(10~100psi), RO나 NF 공정보다 막분리 시스템의 운영비가 적은 특징을 갖고 있다.

MF 분리막 공정 적용 분야의 시장규모는 막분리공정 분야 중 가장 크며 제균, 의약품, 생물공학제품에까지 이르고 있다. 의약품에의 적용은 MF 공정의 주된 시장이며 비교적 분자량이 크고 열에 민감한 항생제, 혈액제, 안과용 제제, 주사액의 제균, 혈액정화 등에 이용되고 있다. 발효공업 분야에서는 pore size  $0.45\mu\text{m}$ 의 MF 막이 와인 제조의 전처리 공정에 이용되고 있다, 따라서, MF 공정은 단일 공정으로서 뿐만 아니라 UF, NF 혹은 RO 공정과의 연계하에 운용시키면 각종 식품용 생리활성 물질 등을 상변화 없이 효율적으로 분리 및 정제가 가능하다<sup>3)</sup>.

#### 나. 한외여과 공정 (Ultrafiltration)

Ultrafiltration (UF)는  $10\sim 200\text{\AA}$  이상의 크기를 갖는 천연 고분자성 거대물질들

(proteins, starch, gums)이나 콜로이드성 분산물질들(pigments, paints, clays, latex particles)을 분리하는 공정으로서 UF시 분리 대상 거대물질의 분자량 범위는 1,000~1,000,000 daltons에 해당되며 막에 적용되는 막 횡단 압력은 역삼투에 비하여 상대적으로 낮은 압력(1,000 kPa)이 적용된다. UF 공정의 식품산업에서의 적용분야는 우유의 농축과 유청처리, 효소, 과일과 야채 주스의 청징화 및 농축, 알부민등 전통적인 식품가공분야에 집중되어 있다.

UF 공정은 RO 공정에 비하여 분리대상으로 하는 물질들은 분자량이 커서 상대적으로 삼투압이 낮기 때문에 높은 막횡단 압력을 필요로 하지 않는다. UF 공정에서는 한계분자량(molecular weight cut-off, MWCO)의 개념이 중요한 분리변수로 작용하는데 이는 막을 통과할 수 있는 물질의 한계치를 의미한다. 실질적으로 사용막에 의해서 분리대상물질이 90% 배제되었을 때의 분자량을 MWCO라고 한다.

UF 공정에서 흔히 관찰되는 현상으로는 막횡단압력을 올리더라도 더 이상 비례적으로 flux가 증가하지 않는 현상이 나타나는데, flux가 어느 정도 비례적으로 증가하는 부분을 pressure controlled region이라고 하도, 적용압력의 증가가 더 이상의 flux 증가에 큰 영향을 주지 못하는 부분을 mass-transfer controlled region이라고 구분 지우고 있으며, 산업적으로 최적 막횡단 압력을 산출할 때에 유의해야할 사항이다. UF 공정에서 flux의 감소는 크게 feed 용액의 물성변화와 관련된 막 침착현상(membrane fouling)과 농도 분극 현상(concentration polarization) 때문에 발생하며

막 분리시 flux를 저하시키는 주요 요인이다. 용매가 다공질의 한외여과막을 통과할 때는 Hagen-Poiseuille 법칙을 따르므로 고형물이 농축되면 feed의 점도와 밀도가 상승하고 확산도가 감소하여 물보다 낮은 flux를 나타낸다. 농도분극 현상은 단백질과 같은 수화성 콜로이드물질이나 펙틴, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 같은 물질에 의해 발생하며 이들 물질들은 막 표면에 점성이 있는 겔 층(gelatinous-type layer)을 형성한다. 막 표면에 용질의 농도가 국부적으로 증가하면 삼투압이 현저히 증가하여 구동력(driving force =  $\Delta P_T - \Delta \pi$ ,  $\Delta P_T$  = transmembrane pressure,  $\Delta \pi$  = osmotic pressure of retained solutes)이 줄어들어 결과적으로 flux가 감소한다. 분리 초기에 막으로 용질이 전달되어 점차 막 표면에 쌓이게 되면 boundary layer내에 농도 차가 발생하며 이로 인해 확산 현상(diffusional effect)이 일어나 용질을 투입 유체 쪽인 반대 방향으로 전달시킨다. 결과적으로 일정 시간 경과후 flux가 정상상태에 도달하게 되는 것은 위에 언급한 두 현상이 평형을 이루게 되기 때문이다.

UF 공정은 전통적으로 우유의 농축과 유청처리, 효소, 과일과 야채 주스의 청징화 및 농축, 알부민등 전통적인 식품가공분야에 집중되어 왔지만, 앞으로는 각종 생리활성기능(면역기능부활, 항염증, 혈당강하, 항종양)이 알려진 천연물 유래 기능성소재 및 의약품의 원료로 주목받고 있는 다양한 종류의 점질다당(mucopolysaccharides)의 분리 정제에 적용할 가치가 높다. 한외여과 공정은 특히 식품산업 분야에서의 활용도가 크다. 치즈 유청(chese whey)으로부터 유청 단백질의 분리, 치즈 제조를 위한

우유의 농축, 과일즙의 청징(clarification) 등에 한외여과 공정이 사용되고 있다. UF 공정의 또 다른 중요한 응용분야로는 전착도료의 회수공정, 의약/반도체 산업용 순수 제조공정, 음용수 제조공정, 생물공학의 후처리(downstream)공정 등을 들 수 있다. 최근에는 포도주의 청징, 식초의 양조, 젤라틴의 농축 등에도 UF 공정이 사용되고 있다.

#### 다. 나노여과 공정 (nanofiltration)

Nanofiltration (NF) 공정은 사용되는 분리막의 pore size가 1~2nm이므로 나노분리라고 부르고 있으며, 일명 loose RO라고도 불리며 역삼투와 한외여과의 중간 범주에 해당된다. NF공정은 용액중의 다가 이온이나 저분자의 유기물을 제거하는데 적합한 공정으로서 NF 공정의 분리구동력 역시 RO, UF 공정과 마찬가지로 분리막의 feed 쪽과 permeate 쪽간의 압력차에 있다. 분자량으로는 300~1,000 정도의 물질들이 NF막을 통과한다. NF 공정에서는 NaCl과 같은 1가 이온을 잘 투과시키므로 RO 공정(500~1,500 psi)에 비해 극복해야할 삼투압이 상대적으로 적어 역삼투압이 작게 걸린다. 대개의 경우, NF를 이용한 desalting이나 deacidification의 경우 150~450 psi 정도면 충분하다.

NF막에 의한 염의 배제기작은 주로 ion과 분리막간의 정전기적 반발력에 기인하며, 하전을 띄지 않는 물질의 배제는 크기 차이에 의한다. 일반적으로 당류(포도당,

설탕, 유당)의 배제율은 제조회사별 NF막에 따라 차이는 있지만 90~98%인 것으로 알려져 있다. RO막과 NF막을 비교해 보면 대부분의 NF막은 분리막 표면이 음전하를 띠고 있으므로 RO막에 비하여 친수성이 크며 구조상으로도 RO막 보다 덜 치밀하여 투수성이 높다. 분리막 표면의 독특한 음전하 때문에 소수성 콜로이드, oil, 단백질, 유기물 등에 의한 fouling이 상대적으로 적은 편이지만, 전하를 띠고 있는 물질 분리에 있어서는 심각한 fouling현상을 야기시킬 수도 있으므로 주의할 필요가 있다.

NF 공정은 물의 연수화 공정에 이은 교환법을 대체시키는 공정으로 이용되고 있으며, 지금까지 식품산업 분야에 NF공정이 이용된 예로서는 yeast제조시의 세척수 처리, 치즈제조 후 유청으로부터의 염제거 등을 꼽을 수 있다. 생리활성물질의 분리 적용 예로는 cyclodextrin 제조시 UF 공정을 통해 효소를 제거한 후 건조 비용의 절감을 위해 NF막을 사용할 수 있으며, 각종 아미노산 제조공정의 분리, 다양한 생리활성 효과를 보이는 저 분자량 peptide의 분리 정제, 분자량 1,000 미만의 antibiotics의 제조·분리 공정 등에 다양하게 적용될 수 있다.

라. 역삼투 공정 (reverse osmosis)

삼투(osmosis) 현상은 희석된 쪽에서 농축된 쪽으로 반투과성 막(semi-permeable membrane)을 통하여 화학적 전위차(chemical potential differences)를 구동력(driving force)으로 하여 용매가 이동하는 자연계의 현상을 말한다. 이러한 자연적

인 삼투현상의 구동력과 반대 방향으로 인위적인 압력구배(pressure gradient, 30~100 기압)를 가하면 삼투현상과는 반대로 고농도 용액 쪽의 용매가 저농도 용액 측으로 역류하게 되는데, 이러한 현상을 이용하여 용매(물)를 제외한 용액내의 모든 성분 물질들을 거르는 dewatering technique를 역삼투(reverse osmosis, RO)라고 한다.

RO 공정은 1970년대에 해수의 담수화에 적용된 이래 폐수처리 뿐만 아니라 유기물의 회수, 식품의 농축, 반도체산업용 초순수(ultrapure water)의 제조, 의약품 및 생물학 제제의 분리·농축에 적용되어 산업적으로 성공한 바 있다.

RO 공정은 용존염의 분리제거효율이 높아 생리활성물질 제조 및 분리 공정에 사용되는 염의 탈염과정에 이용될 수 있으며, 분자량이 극히 작은 생리활성 유기물들 중 aromatic hydrocarbon의 분리 조작에 대한 이용가능성이 많이 제시되고 있으므로 식품 유래 생리 활성물질들 중에서는 각종 flavonoids, carotenoids, saponins, natural colors, antioxidants 등의 분리 농축에 적용할 만한 공정이다<sup>3)</sup>.

#### 마. 막오염(Membrane fouling)

UF 공정 (특히 단백질 용액의 한외여과)에 있어서 막투과량은 일반적으로 조작시간이 증가함에 따라 점차 감소하게 된다. 이처럼 조작시간에 따라 막투과량이 감소하는 이유는 막표면 또는 막세공 내에 콜로이드, 입자상 용질, 거대분자 등의 유·무기물들의 비가역적 침착현상을 통상 막오염(membrane fouling)이라 한다. 농도분극

(concentration polarization)은 막표면에의 용질의 가역적 침착현상이기 때문에 조작조건의 변화(예, 도입액 유속의 증가)로서 상당한 정도까지 제어가 가능하나, 막오염은 용질의 비가역적 침착현상이기 때문에 단순히 조작조건을 변화시키는 방법으로는 제어가 거의 불가능하여 한외여과의 실제적 응용시 심각한 문제를 야기시키게 된다<sup>4)</sup>.

거대분자 용액의 한외여과에서 조작시간에 따른 막투과량 감소는 통상 3단계 과정으로 구분한다. 1단계는 한외여과 조작이 시작된 이후 수분동안에 걸쳐 일어나는 막투과량의 급속한 감소 단계로서 막표면 근방에 농도 분극층이 형성되는 과정이다. 2단계는 막투과량의 급속한 감소 이후부터 약 1시간까지의 보다 완만한 막투과량 감소 단계로서 용액 중에 포함된 분리대상 물질이나 기타의 유·무기물들이 막표면 또는 막세공 내에 흡착(주로 단분자 흡착)되는 과정이다. 3단계는 1시간 이후의 막투과량이 서서히 감소하는 단계로서 2단계에서의 흡착층 위에 추가적으로 용질들이 더 흡착 또는 침지되고 이 침지층이 고형화(겔화)되는 과정이다.

대부분의 한외여과막은 다양한 크기를 갖는 세공들로 구성되어 있기 때문에 용질이 흡착 또는 침착되는 막오염 현상이 일어나면 막 세공의 일부 또는 전체가 막히거나 세공 크기가 줄어들게 된다. 이렇게 되면 필연적으로 막투과량이 감소하게 되고 막의 세공분포가 달라져 막이 갖는 본래의 분리성능(분획분자량)에 변화를 초래시킨다. 막오염 현상은 막의 세공분포 변화와 이에 따른 막투과량 변화로서 1) 세공크기

감소(Case A) 2) 세공 막힘(Case B), 3) 겔층 형성(Case C)의 3가지 경우로 구분하였다. Case A와 B의 경우에는 막 본래의 분획분자량에는 거의 변화가 없으나 크기가 작은 세공들이 막히게 됨으로서 막투과량이 감소되며, Case C의 경우에는 막의 분획분자량과 막투과량 모두가 감소하게 된다.

특정 용질을 함유한 용액의 한외여과시, 막오염의 정도는 용액의 물리적, 화학적 특성(농도, pH, 이온강도 등), 막재질 및 특성(소수성 정도, 전하량, 다공도 및 세공 분포 등), 조작조건(온도, 압력차, 도입액 유속 등)에 따라 크게 달라진다. 즉, 도입액의 농도를 증가시키면 일반적으로 막표면에서의 가역적 오염(농도분극 형성)과 막 세공 내에서의 비가역적 오염을 유발시켜 막투과량을 감소시킨다. 일반적으로 친수성 막보다는 소수성 막에서의 단백질 용질의 흡착량이 크며 따라서 소수성 막의 경우에 막오염이 심하다.

막투과량이 크면 막세공에서의 높은 전단력을 유발시키므로 용질 (특히 단백질)의 변성(denaturation)을 유발시켜 막오염을 가속화시키며 막 본래의 분획분자량을 변화시킨다. 한편 단백질 이외의 용액의 경우에는 조작온도가 증가하면 점도가 감소하고 확산계수가 증가하므로 막오염이 작아지나, 단백질 용액의 경우에는 열변성에 의한 단백질 응집체의 형성으로 막오염이 더 심해지게 된다. 또한 조작 압력을 증가시키면 초기에는 막투과량의 증가를 기할 수 있으나 조작시간이 증가하면서 오히려 막오염을 증가시키게 된다. 도입액 유속을 증가시키면 막 모듈의 유로 내에 난류흐름을



유발시키므로 막오염 형성을 어느 정도 억제할 수 있으나, 과도한 유속은 용질의 변성을 유발시킬 수도 있으며, 펌핑비용 등의 조작비용을 상승시키게 된다.

#### 바. 막오염의 제어

분자량이 작은 염류 및 무기이온을 주 분리대상으로 하는 RO의 경우에는 다양한 도입액 전처리법들 (염소 처리, 응집제 처리, 열처리, 활성탄 흡착, pH 조정 등)이 사용되고 있으나, 단백질 물질을 주 분리대상으로 하는 UF의 경우에는 도입액의 전처리에 상당한 주의가 필요하다. 세심한 검토 없이 도입액의 화학적/물리적 전처리를 하게 되면 단백질 물질의 변성을 유발시켜 오히려 막오염을 가중시킬 수도 있다.

물질전달 계수를 증가시키는 방법으로서 가장 널리 사용되고 있는 방법은 도입액의 유속을 증가시키는 것이다. 물론 도입액의 유속을 증가시키면 막오염의 형성을 상당히 억제할 수 있으나, 이에 따른 동력 소요량 (펌핑 에너지)의 증가도 고려해야만 한다. 일반적으로 동력 소요량은 유속의 3승에 비례한다. 또한 단백질 용액의 경우 도입액 유속의 증가는 단백질의 변성을 유발시켜 막오염을 가중시킬 수도 있다. 따라서 도입액과 막모듈의 형태에 적절한 최적 도입 유속의 설정이 필요하다.

압력이 증가되면 농축이 일어나면서 농도 분극층이 형성되므로 flux는 크게 증가하지 않는다. 이 상태에서 더욱 압력을 증가시키면 gel층 상에서 용질의 상호확산은 초기상태와는 달리 새로운 평형상태를 유지하면서 flux(여액)는 더 이상 증가하지 않

게 된다. 이때 membrane fouling은 급격히 진척되면서 막성능이 떨어지게 되므로 필요이상으로 압력을 높이게 되면 운전비가 증가될 뿐만 아니라 막 성능도 저하되므로 항상 적당한 압력에서 운전하여야 한다<sup>5)</sup>.

#### 사. 식품산업에서 막분리 응용

상기에서 서술한 막분리가 가지는 여러가지 장점 (에너지 비용절감, 열변성방지 등)으로 인하여 유가공관련산업<sup>6-14)</sup>, 주스산업<sup>15-19)</sup> 효소산업<sup>20-26)</sup> 등에 적용이 활발하게 진행되고 있으며 UF와 RO 가 함께 사용된 경우도 적지 않다. 예를 들면 발효액으로부터 glutamic acid를 회수하기 위하여 막분리공정이 적용되었다. 발효액을 UF공정을 거친 뒤 retentate는 diafiltration (DF) 공정을 통하여 물로 product를 헹구어 불순물을 제거하였으며 DF permeate는 RO공정을 통해 농축시켰다. 막분리공정을 이용한 박테리아 cell로부터 glutamic acid의 분리는 후속 공정인 evaporation과 crystallization 공정의 효율을 증가시킬 수 있었다<sup>27)</sup>. 또 다른 예로서는 고구마전분 공정에서의 폐수처리를 들 수 있다. 여기서는 전분제조 공정시 발생한 폐수를 UF와 RO공정을 통해 BOD와 COD를 낮추었다. UF 공정을 먼저 수행한 후 UF permeate를 RO를 사용하여 농축하였다<sup>28)</sup>.

### 3. 본 연구에의 적용

본 연구에서 목적하는 유효 성분은 분자량이 대략 400 Dalton 정도이다. 이들이 추출시 쉽게 용매에 용해되어 추출될 수 있도록 두층을 건조하여 마쇄함으로써 세포 벽이 파열되어 유효 성분이 쉽게 용해되고 또한 확산되어 나오는 시간이 단축될 수 있도록 전처리를 하는 것이 필요하다. 또한 추출시 평형에 도달하였을 때의 농도 및 시간, 용매/추재비 등이 추출에 미치는 효과를 조사함으로써 효율적인 추출조건의 확립을 기하였다. 얻어진 추출물은 원심분리를 통하여 추출잔사로부터 분리하고 RO 공정에 의하여 유효 성분을 농축하기 앞서 microfiltration과 ultrafiltration을 통하여 분자량이 큰 이물질을 제거함으로써 정제효과를 얻음과 동시에 RO 공정에서의 fouling이 급속히 일어나는 것을 방지하고자 하였다. 즉 분획분자량이 300 kDa인 membrane을 이용하여 MF를 행함으로써 콜로이드성 입자들을 제거한 후, 분획분자량이 30K Dalton인 membrane을 이용하여 UF를 행하고 여기서 얻어진 permeate의 농축을 시도하고자 하였다. 즉 UF를 통하여 추출물에 존재하는 고분자물질을 제거함에 있어서 fouling을 최소화하고 permeate flux를 최대로 할 수 있도록 공정 변수 (TMP, cross flow rate)를 설정하고 이어서 RO를 수행함에 있어서 필요한 기초자료를 확립하고자 하였다.

## 제 2절 연구개발 내용 및 범위

전년도 연구결과를 바탕으로 하여 서론에서 서술한 사항을 중심으로 하여 추출과 관련된 최적조건을 확립하고 확립된 추출조건하에서 두층으로부터 유효 성분을 추출하고 원심분리 및 여과를 통하여 입자가 큰 고형분을 제거하였다. 이어서 microfiltration과 ultrafiltration을 통하여 거대분자를 제거하고 reverse osmosis를 통하여 유효 성분을 농축하고 동결건조를 통하여 건조를 행하였다. 이러한 일련의 연구를 수행함에 있어 향후 산업화를 염두에 두고 볼 때, 추출과 분리·농축공정이 가장 중요하므로 이를 중심으로 하여 연구를 수행하였다.

### 1. 연구재료 및 방법

#### 가. 시료

두충나무의 잎, 가지, 열매, 껍질을 2:1:1:1로 혼합하여 시료로 사용하였다.

#### 나. Trap Filter

고형분 제거를 위해 사용된 trap filter (Pall-Filtron, U.S.A)의 pore size는 5  $\mu\text{m}$  이며, 유속은 700  $\text{ml}/\text{min}$  이었다.

#### 다. 추출조건

용매/추재 비율을 달리하여 (10:1, 20:1, 50:1, 100:1, 200:1) 상온에서 200rpm으로 교반하면서 50% ethanol을 추출 용매로 하여 2시간 동안 추출하였다.

#### 라. Reverse Osmosis를 위한 전처리 공정

추출액을 거르로 여과한 후 10,000rpm에서 20min간 원심분리 후 trap filter를 통과시켰다. Reverse Osmosis (RO)과정 중에 fouling을 유발할 수 있는 거대분자를 제거하기 위한 전처리과정으로 Microfiltration (MF)와 Ultrafiltration (UF)를 실시하였다.

#### 마. Ultrafiltration System

UF system은 시료를 공급해주는 시료탱크, 막분리가 일어날 수 있는 구동력을 제공하는 펌프, 실제 막분리가 일어나는 한외여과 module, 압력과 유량을 조절하는 valve, 시료가 지나가는 통로가 되는 pipe 등으로 구성되어 있으며 (Fig. 21) retentate의 flow rate는 유속계 (NF10-TTN, Aichi Tokei Co., Ltd., Japan)를 사용하여 측정하였다.

#### 바. UF Membrane

한외여과막은 Pall사 (Pall corp, New York, U.S.A)의 cassette type TTF (Tangential Flow Filtration) 제품을 사용하였다.

#### 사. UF 공정조건

UF는 분획분자량이 300 kDa인 membrane을 사용하여 일차로 실시하였다. 여기서 얻어진 permeate를 분획분자량 30 kDa인 membrane을 사용하여 재차 실시하였다.

#### 아. 최적공정 TMP

UF농축과정에서 최적공정 TMP선정은 막오염과 관련하여 일정한 retentate flow rate에서 permeate flux를 최대로 하면서 TMP를 최소로 하는 구간으로 정하였다.

#### 자. 한외여과막의 세척

한외여과막의 세척은 0.2N NaOH를 사용하여  $p_{in}/p_{out}$  (30~40psi/20~30psi), retentate flow rate 2.0~4.0 l/min로 45분간 순환시켰으며 증류수를 사용하여 permeate flux를 측정하여 세정이 완료되었음을 확인하였다.

#### 차. Reverse Osmosis System

RO system (DDS Filtration, Denmark)은 UF system과 유사한 형태로 구성되었으나

UF의 경우보다 고압에서 작동되기 때문에 pumping시 시료의 온도 상승을 막을 수 있도록 열교환기가 장착되어 있었다 (Fig. 22). 본 연구에서 사용된 membrane은 (HR95PP, DOW Co. Ltd., Denmark) pore size의 salt rejection율이 95%이었으며 재질은 polypropylene이었고, 여과면적은  $0.018 \text{ m}^2/\text{sheet}$ 로 본 연구에서는 10장을 장착하여 사용하였다.

#### 카. Freeze Drying

Reverse Osmosis 공정에서 농축된 농축액은 감압 증발을 통하여 ethanol을 제거한 후 동결건조를 실시하였다.

## 2. 연구 결과

### 가. 추출조건의 설정

용매/추재비를 20으로 하고 ethanol의 농도를 30%, 50%, 90%로 각각 달리하여 추출을 행하였을 때, 추출물에서의 총 유효 성분의 농도는 각각  $195 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $125 \mu\text{g}/\text{ml}$  이었으며 추출농도가 50%인 것이 가장 효율적인 것으로 나타났다. 따라서 50% ethanol을 이용하여 추출하였다.

용매를 사용하여 고체로부터 목표 물질을 추출할 때에는 용매를 가장 적게 사용하여 원하는 물질을 추출해 내는 것이 다음 공정 즉 용매를 제거하는 공정에 부담을 주

지 않게 된다. 또한 적은 양의 용매로 추출하는 것이 보통 고농도의 추출을 할 수 있어 바람직하다.

용매/추재비 (10, 20, 50, 100, 200)를 각각 달리하여 추출을 행하여 용매/추재비가 유효 성분의 추출에 미치는 효과를 조사하였다. 추출된 총 유효 성분의 양을 통하여 비교하였을 때 추출개시 후 약 30분이면 실질적인 평형에 도달함을 알 수 있었다 (Fig. 23). 추출이 이렇게 빨리 진행되는 것은 추재의 입도가 매우 작아서 (30~100 mesh) 추출된 유효 성분이 고체표면에서 액체상으로 확산되는데 소요되는 시간이 매우 짧았기 때문인 것으로 사료된다.

한편 용매/추재비가 증가할수록 추출된 총 유효 성분의 농도는 감소하는 전형적인 추출곡선을 나타내었다. 즉 용매/추재비가 10인 의 경우가 유효 성분의 양이 가장 높아서  $380\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었고 20, 50인 경우는 각각  $200\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $75\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로써 10인 경우와 비교하여 각각 1/2과 1/5에 해당하였다. 즉 추출되는 총 유효 성분의 양은 거의 일정하였으며 용매/추재비가 높을수록 희석되는 결과를 나타내었다. 추출된 유효 성분의 각 성분별로도 동일한 결과가 관찰되었으며 두층에 존재하는 유효 성분 중에서 가장 많은 양을 차지하는 Eu-1의 경우는 Fig. 24 와 같았다.

용매/추재비가 낮을수록 원심분리 후에 두층내에 흡수되어 있는 용매의 양이 상대적으로 많기 때문에 용매/추재비가 10에서 20, 50, 100, 200으로 증가함에 따라 용매 회수율은 78.5%에서 86.5%, 91.0%, 96.0%, 96.5%로 각각 증가하였다 (표 19). 용매/



추재비가 높을수록 추출에 사용된 추재의 단위 중량당 추출된 Eu-1의 함량은 증가하고 있으나 추출 후의 농축과정에서의 energy 비용을 감안하면 용매/추재비는 낮을수록 오히려 유리하다. 용매/추재비가 10인 경우 추출 후 한외여과공정에서 flux가 현저하게 낮았으며 또한 용매 회수율이 낮은점을 고려하여 용매/추재비가 20인 경우가 가장 바람직한 것으로 판단되었다.

따라서 용매/추재비를 20으로 하여 추출을 행하였으며 이때 Eu-1을 비롯한 추출된 유효 성분의 총량과 유효 성분의 성분별 추출곡선을 Fig. 25와 같았다. 추출은 1시간 이내에 완료되고 있음을 알 수 있었으며 추출된 유효 성분의 농도는 약  $20\mu\text{g}/\text{ml}$  이었으며 이 중 Eu-1이 50%를 차지하였으며 Eu-6 등 기타성분이 나머지 25%를 차지하였다. 따라서 본 연구에서는 가장 함량이 많으며 기능성이 뛰어난 Eu-1을 중심으로 연구를 수행하였다.

표 29. 용매/추재비에 따른 추출된 Eu-1의 함량 및 용매 회수율

용매/추재비	추출물의 Eu-1농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	용매회수율 (%)	추재 100g당 추출된 Eu-1 총량 (mg)
10	204	78.5	160
20	107	86.5	185
50	43	91.0	196
100	25	96.0	240
200	9.0	96.5	174

#### 나. Microfiltration

추출 후 전처리 (원심분리 및 trap filter)를 거친 9 l의 추출액을 300 kDa membrane으로 microfiltration를 하였을 때 permeate flux는 초기에  $55.5 \text{ l}/\text{m}^2 \cdot \text{hr}$ 에서 말기에는  $37.5 \text{ l}/\text{m}^2 \cdot \text{hr}$ 로 감소하였다. UF에 총 소요된 시간은 약 2.5 hr 이었으며 약 8.6 l의 permeate가 얻어졌다. 이는 원심분리 과정에서 커다란 입자들이 대부분 제거되었기 때문에 그로 인한 membrane fouling이 그다지 크지 않았기 때문인 것으로 사료된다.

#### 다. UF시 최적공정압력선정

Transmembrane pressure difference (TMP)를 낮게 유지하면서 permeate flux를 최대로 얻는 것이 한외여과 공정의 최적조건이 된다. 이는 membrane fouling이 생기는 관점에서 permeate 에 대한 상대적인 fouling을 고려할 때 막오염을 최대한 줄일 수 있게 한다. 막오염과 농도분극은 TMP가 증가할수록 커지게 되고, cross flow rate (CF)가 커질수록 감소하게 된다. 하지만 TMP를 증가시킬 때 pump 속도를 높여 CF를 증가시키는 방법도 있기 때문에 최적 조건이 존재하게 된다. 그러므로 TMP는 낮게 하고 CF는 높게 하면서 permeate flux를 최대로 얻는 조건을 찾아야 한다. 따라서 각각의 constant retentate cross flow rate에 대하여 TMP변화에 따른 permeate flux를 측정하였다 (Fig. 26). 높은 TMP는 fouling을 증대시키는 효과를 지니고 있으므로 가능한 한 TMP를 낮게 유지하는 가운데 높은 permeate flux를 보이는 구간이 최적 공정조건이 된다.

#### 라. Ultrafiltration

Microfiltration을 거친 후 얻어진 permeate를 30 KDa membrane으로 UF를 시도한 결과는 Fig. 7과 같았다. 용매/추제비가 20인 경우 permeate flux는 초기에는  $6.3 \ell / m^2 \cdot hr$  이었으나 2배 농축되는 동안에  $3.3 \ell / m^2 \cdot hr$ 로 감소하였고 5배 농축시에는  $1.3 \ell / m^2 \cdot hr$ 를 유지하였다. 한편 용매/추제비가 50과 100인 경우 초기 flux는 각

각  $8.0 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ 와  $8.7 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ 로 용매/추재비가 20인 경우의  $6.3 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$  보다 높았다. 그러나 용매/추재비가 50과 100인 경우는 20인 경우보다 각각 2.5배 및 5배 희석된 상태이므로 이들이 UF 공정에서 2.5배 및 5배 농축되었을 때의 flux를 살펴보면 각각  $3.7 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ 와  $2.7 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ 로 용매/추재비가 20인 경우의 초기 flux인  $6.3 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$  보다 훨씬 작은 값을 보였다 (Fig. 27). 즉 UF 공정중의 fouling으로 인하여 flux저하를 가져오는 까닭에 용매/추재비가 높은 상태에서 추출을 시도하는 경우 농축에 소요되는 추가적인 energy 비용은 물론 membrane fouling에 따른 flux저하의 부담이 작용하기 때문에 가능한 용매/추재비를 낮게 유지하는 것이 필요함을 알 수 있었다.

UF가 진행됨에 따라 용매/추재비가 20인 경우 Eu-1 함량은 retentate의 경우 초기의  $295.5 \mu\text{g/ml}$ 에서 5배 농축되었을 때  $567.7 \mu\text{g/ml}$ 로 약 1.9배 증가하였다 (Fig. 28). 이와 같은 현상은 용매/추재비가 50과 100인 경우에도 동일하게 나타났으며 각각  $119.9 \mu\text{g/ml}$ 에서  $313.8 \mu\text{g/ml}$ 로,  $54.3 \mu\text{g/ml}$ 에서  $173.0 \mu\text{g/ml}$ 로 증가하였다.

한편 permeate의 경우  $124.5 \mu\text{g/ml}$ 에서  $164.8 \mu\text{g/ml}$ 로 약 1.3배 증가하였다. 이는 retentate쪽의 농도가 증가함에 따른 영향인 것으로 판단되었다. 본 연구에 사용된 membrane의 pore size ( $30,000 \text{ Da}$ ) 와 유효 성분의 분자량 ( $<1,000 \text{ Da}$ )을 비교하여 볼 때 permeate와 retentate의 경우 초기와 UF가 끝난 후 모두 동일한 유효 성분 농도를 보일 것으로 기대 되었으나 본 연구에서는 예상외로 증가함을 보였다. 이에 대

하여는 향후 구체적인 연구가 더 진행되어야 할 것이나 사용한 용매 (50% ethanol)의 휘발성으로 인하여 UF과정중에 증발이 진행되어 추출액 자체가 농축되었으며 아마도 유효 성분이 30 kDa보다 분자량이 더 큰 거대분자에 흡착되어 있는 것으로 여겨진다.

#### 마. RO시의 온도영향

RO를 수행함에 있어서 pump가 고압에서 작동하는 까닭에 시료의 온도가 상승하게 되며 온도는 시료의 점도에 크게 영향을 미치므로 flux에 영향을 주게 된다. 따라서 본 연구에서는 항온수조를 사용하여 feed tank의 온도를 일정온도로 유지하였으며 pumping 후에 membrane을 통과하기 이전에 열교환기를 설치하여 온도가 상승하는 것을 방지하였다.

일정 유속하에서 TMP를 100, 200, 300, 400, 500, 600 psi로 변화시키면서 flux를 측정할결과 20℃에서 100psi 증가함에 따라 flux는  $1.7 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ 씩 증가하는 직선적인 관계를 나타내었다. 공정압력이 증가함에 따라 flux가 증가되는 폭은 온도가 높을수록 커서 25℃, 30℃, 35℃의 경우 각각 100psi당 2.6, 3.0, 3.5  $\text{l/m}^2 \cdot \text{hr}$ 를 나타내었다. 일정 압력하에서 온도가 증가할수록 flux가 증가하였으며 이는 점도저하에 따른 membrane 투과시 저항의 감소에 기인한 것으로 보여진다.

#### 바. RO에 의한 농축

30k membrane을 사용한 UF에서 얻어진 permeate를 사용하여 500psi, 30℃에서 농축을 실시한 결과 permeate의 flux는 초기에  $15 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ 에서 concentration factor가 8로 증가함에 따라  $5 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ 로 감소하였다. 이 경우 permeate에서는 유효 성분이 전혀 나타나지 않았다. 이는 RO에 사용한 membrane의 pore size가 유효 성분의 분자량보다 작아서 membrane를 통과하지 못한 것으로 사료된다. 한편 retentate의 경우 초기의 Eu-1의 함량이  $148 \mu\text{g/ml}$ 에서 농축배수가 2, 3, 4로 증가함에 따라  $442 \mu\text{g/ml}$ ,  $715 \mu\text{g/ml}$ ,  $821 \mu\text{g/ml}$ 로 각각 증가하였으며 8배 농축시  $1299 \mu\text{g/ml}$ 로 약 8.7배로 농축되었다. 즉 농축이 진행됨에 따라 예정된 농축배수보다도 조금 더 농축된 결과가 나타났는데 이는 앞서 UF의 경우에서와 마찬가지로 ethanol의 증발에 의한 농축이 아울러 진행되었기 때문인 것으로 사료된다.

#### 사. 동결건조

RO 공정에서 얻어진 retentate의 경우 ethanol이 다량 함유되어 있기 때문에 동결 건조를 바로 행하게 되면 빙점강하가 일어남으로 동결에 시간이 많이 소요됨은 물론 응축기에서의 부하가 크게 작용하게 된다. 따라서 RO 공정에서 8배 농축된 retentate를 진공농축 증발기에서 ethanol을 제거한 후 동결 건조를 실시하였다. 그 결과 500g의 두층으로부터 약 10g의 건조물이 얻어졌으며 건조물에서 총 유효 성분이 차지하는 함량은 약 20%이고 Eu-1의 경우는 약 10%에 해당되었다. 동결건조 후의

Eu-1이 차지하는 양은 약 1.07g으로 사용된 두층잎을 기준으로 하여 볼 때 Eu-1의 수율은 약 0.2%에 해당되었다.

#### 아. 종합적 제조공정 검토

두층으로부터 유효 성분의 추출 및 분리·정제시의 총제조 공정은 Figure 31.과 같다. 비록 본 공정은 실험실적 규모의 설비로 확립되었으나 핵심이 되는 막분리 system의 경우 관련된 공정변수 (막횡단 압력, 유속, 온도 등)의 제어가 가능한 가운데서 얻어진 결과로서 산업화 scale로 수행함에 있어서 별 무리가 없을 것으로 사료된다. 그러나 scale-up 시에 발생하는 예기치 못한 요인들을 보완하기 위하여 현재 소형 pilot plant 규모의 실험이 진행 중에 있다.

### 제 3절 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

두층으로부터의 유효 성분의 추출 및 농축은 membrane filtration을 통하여 이루어질 수 있음이 이상의 연구결과로부터 입증되었다. 이러한 추출 및 농축공정이 확립됨으로써 산업화가 가능하게 되어 폐기물의 재활용과 부가가치를 높이는데 효과가 기대되며 아울러 본 연구를 통하여 개발된 공정은 이와 유사한 천연물의 추출 및 농축에 응용될 수 있으리라 사료된다.

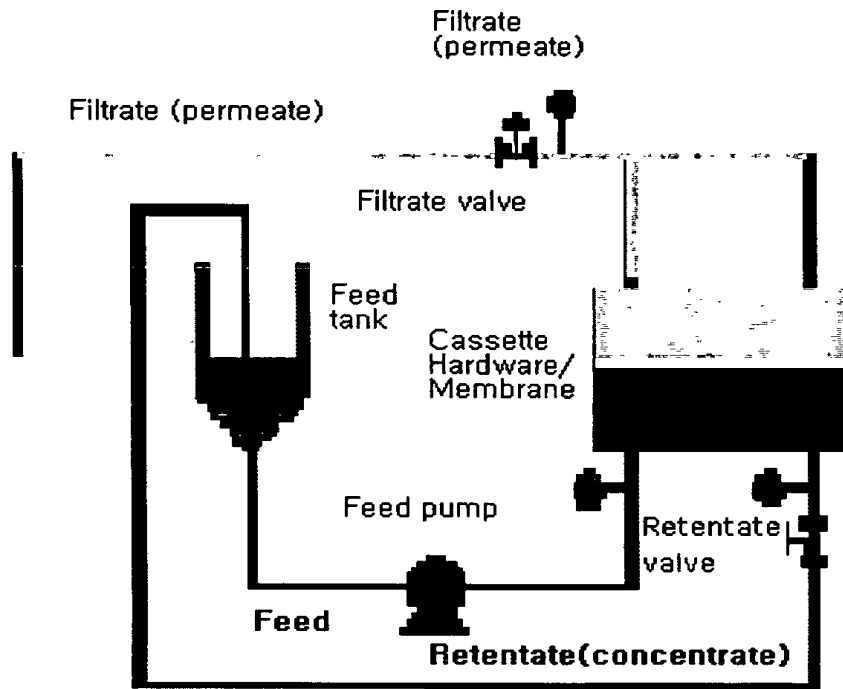


그림 23. Flow diagram of ultrafiltration system



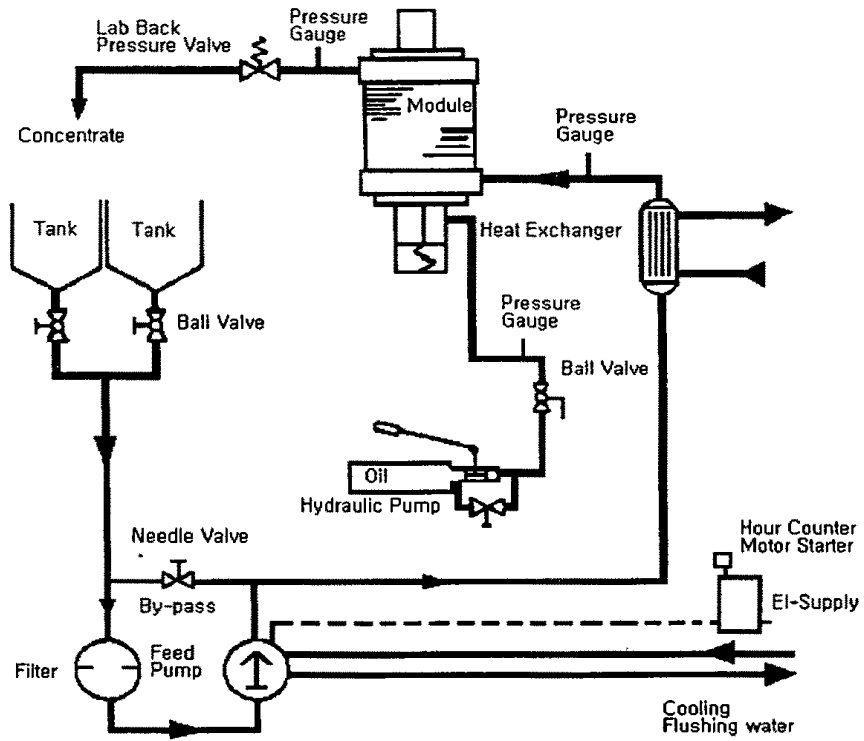


그림 24. Flow diagram of reverse osmosis system

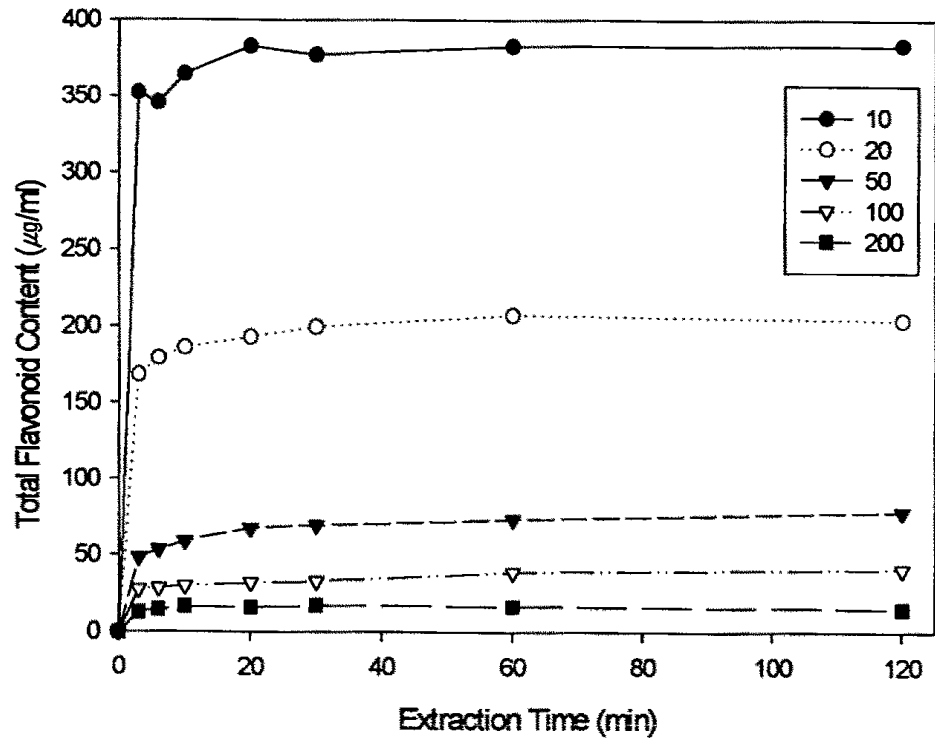


그림 25. Effect of solvent-feed ratio on the total content of the extract

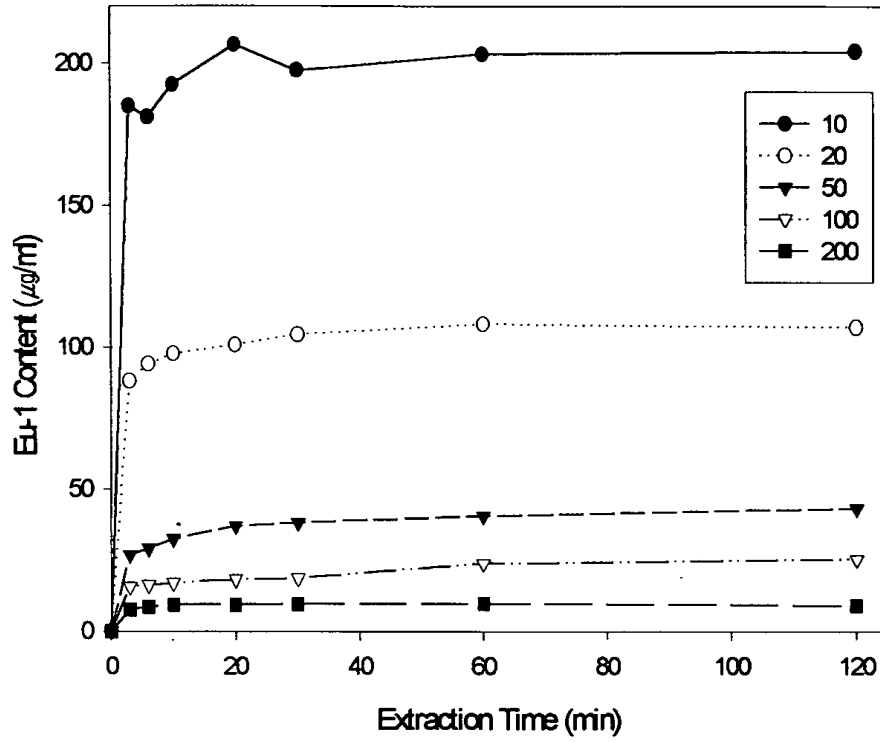


그림 26. Effect of solvent-feed ratio on EU-1 content of the extract

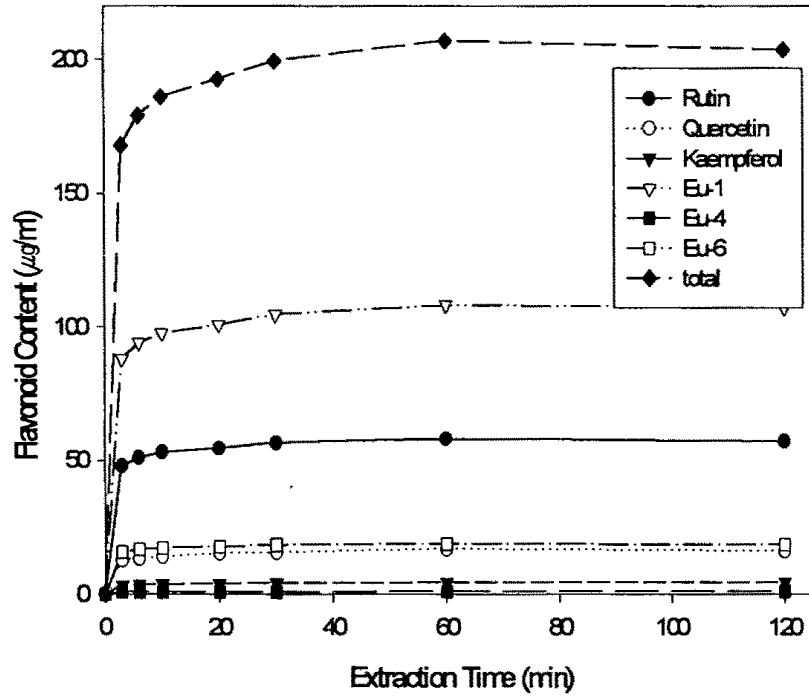


그림 27. Change of EU-1 content in the extract with the solvent-feed ratio during extraction

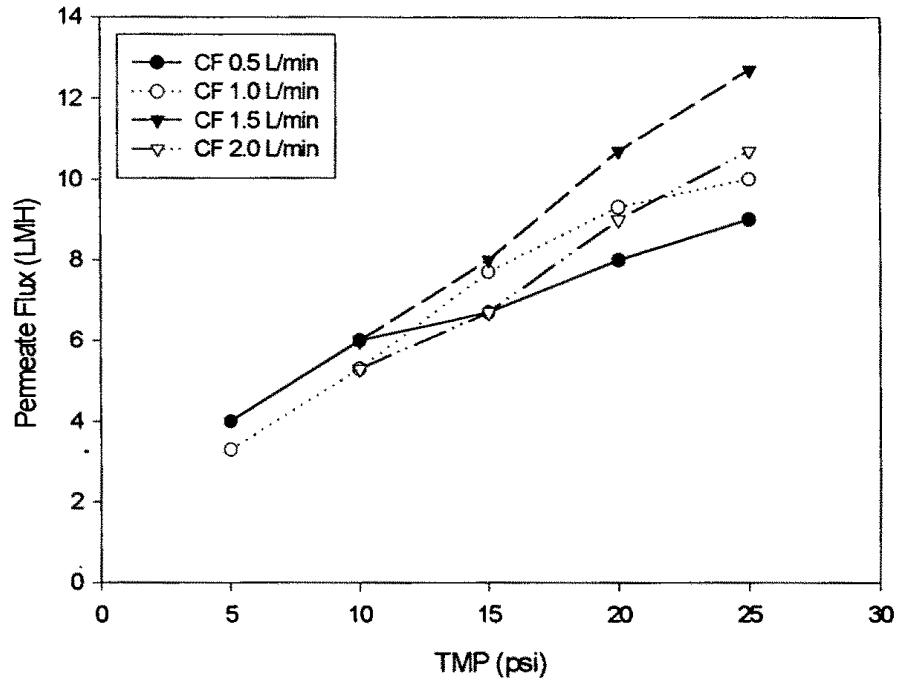


그림 28. Permeate flux with TMP as a function of retentate flow rate during ultrafiltration

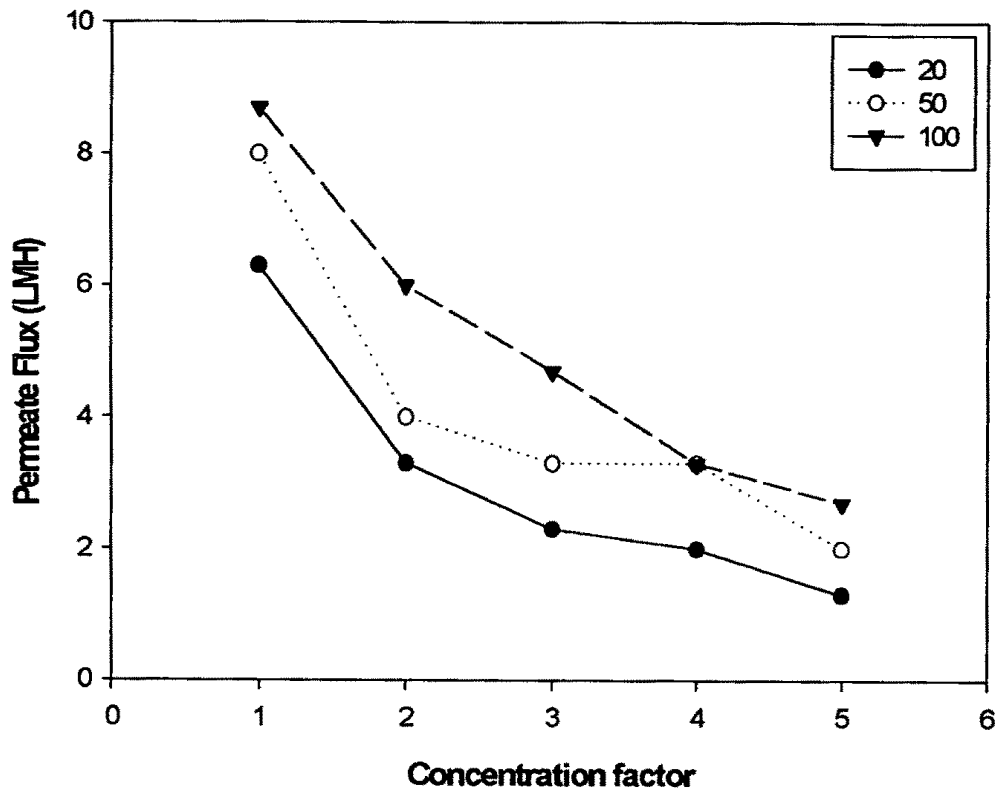


그림 29. Permeate flux as a function of concentration factor with various solvent-feed ratio during ultrafiltration

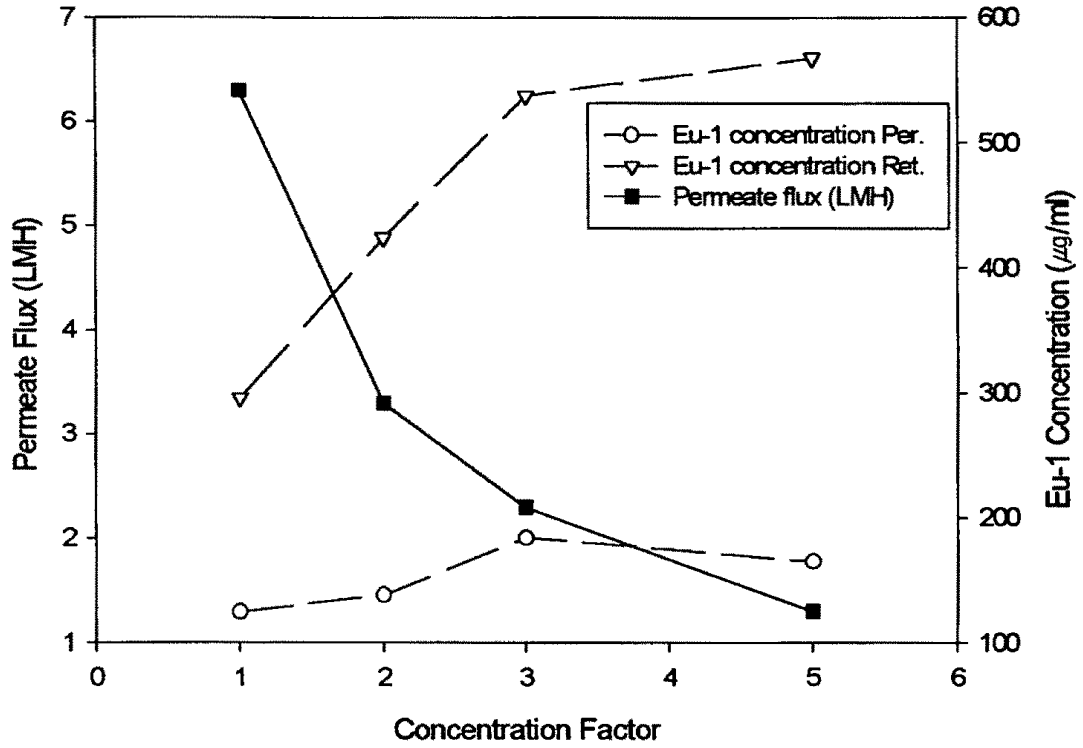


그림 30. Eu-1 concentration and permeate flux as a function of concentration factor during ultrafiltration

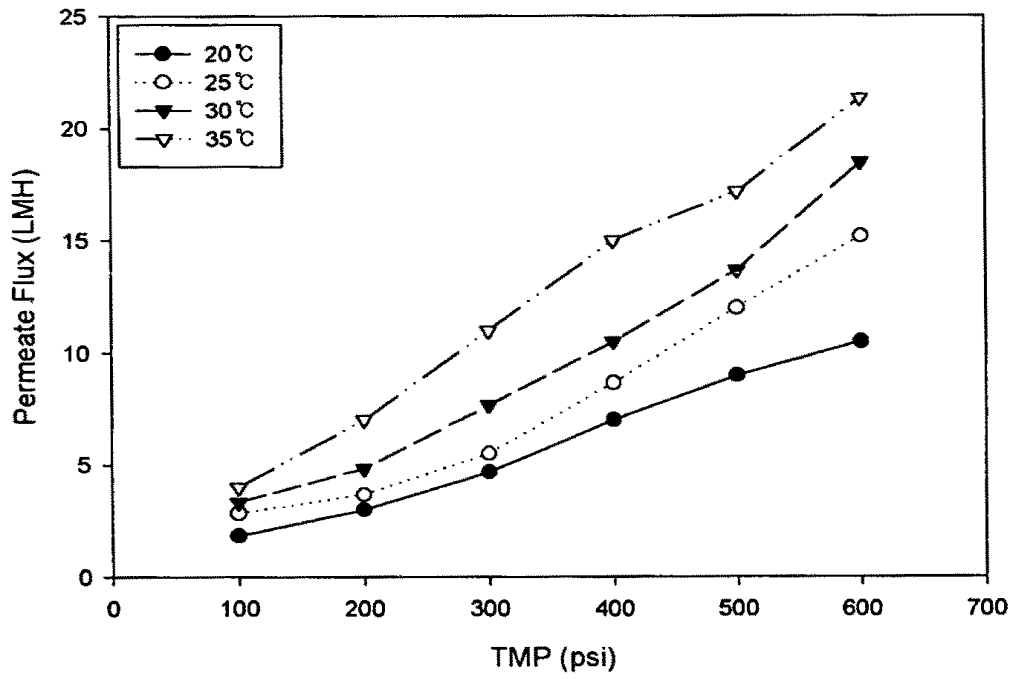


그림 31. Permeate flux as a function of TMP with various temperature during reverse osmosis



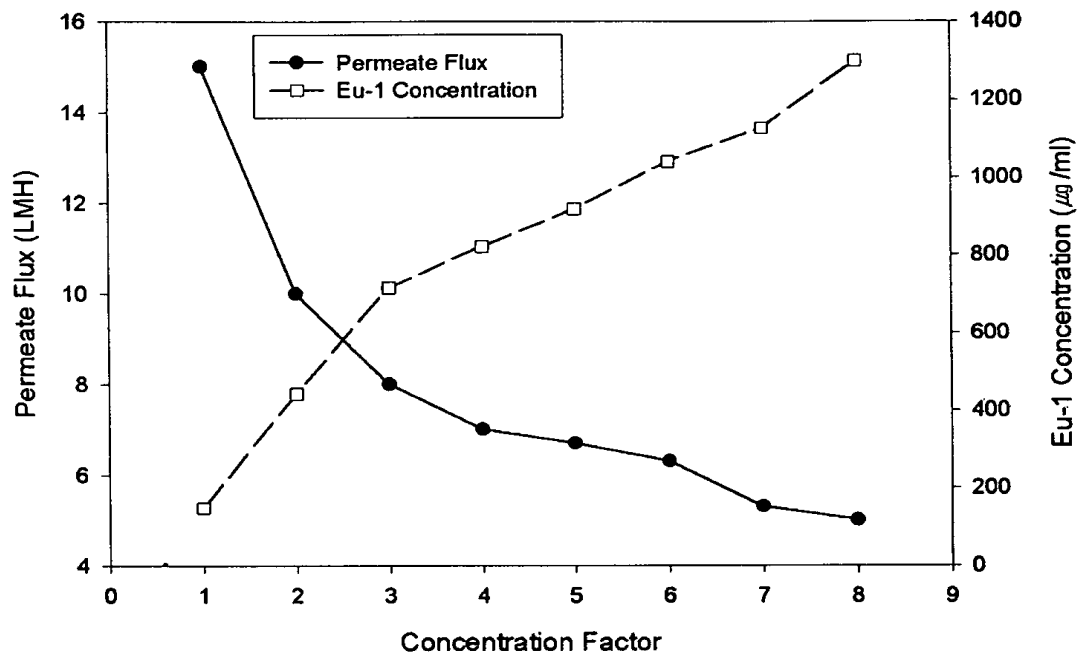


그림 32. Eu-1 concentration and permeate flux as a function of concentration factor during reverse osmosis

## 제 4절 참 고 문 헌

1. 전재근 : 식품공학 이론과 응용. 개문사 (1994)
2. 변유량 : 현대식품공학. 지구문화사 (1996)
3. Geankopolis, C.J. : Transport Processes and Unit Operations, 3rd ed.,  
Prentice Hall International Editions (1993)
4. 민병렬 : 막분리서론. 한국막학회편 막분리기초, 자유아카데미(1996)
5. Cheryan, M. : Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. Technomic  
Publishing Co., Pennsylvania (1998)
6. J. Rodriguez, T. Requena, and M. Juarez: Process for low-fat cheese from  
ultrafiltered milk. *J. Food Sci.*, 63, 665-667, (1998)
7. J. H. Wooychik, P. cooke, and D. Lu: Microporous ultrafiltration of skim

milk. *J. Food Sci.*, 57, 46-48, (1992)

8. I. Higuera-Ciapara, M. Esqueda-Valle, and J. Nieblas: Reduction of aflatoxin M<sub>1</sub> from artificially contaminated milk using ultrafiltration and diafiltration. *J. Food Sci.*, 60, 645-647, (1995)

9. S. Raphaelides, K.D. Antoniou, and D. Petridis: Texture evaluation of ultrafiltered teleme cheese. *J. Food Sci.*, 60, 1211-1215, (1991)

10. M.E. Mangino, L.M. Huffman, and G.O. Regester: Changes in the hydrophobicity and functionality of whey during the processing of whey protein concentrates. *J. Food Sci.*, 53, 1684-1686, (1988)

11. S. K. Sharma, L.K. Ferrier, and A.R. Hill: Effect of modified manufacturing parameters on the quality of cheddar cheese made from ultrafiltered (UF) milk. *J. Food Sci.*, 54, 573-577, (1989)

12. E.A. Arndt and R.L. Wehling: Development of hydrolyzed and

hydrolyzed-isomerized syrups from cheese whey ultrafiltration permeate and their utilization in ice cream. *J. Food Sci.*, 54, 880-884, (1989)

13. Linda fischbach-Greene and Norman N. Potter: Effects of ultrafiltration on retention of minerals and other components of milk. *J. Food Sci.*, 51, 345-347, (1986)

14. M.S. Koschak, O. Fennema, C.H. Amundson, and J.Y. Lee: Protein stability of frozen milk as influenced by storage temperature and ultrafiltration. *J. Food Sci.*, 46, 1211-1217, (1981)

15. Been Huang Chiang and Zer Ran Yu: Fouling and flux restoration of ultrafiltration of passion fruit juice. *J. Food Sci.*, 52, 369-380, (1987)

16. Silas Rwabahizi and Ronald E. Wrolstad: Effects of mold contamination and ultrafiltration on the color stability of strawberry juice and concentrate. *J. Food Sci.*, 53, 857-861, (1988)

17. S.F. Barefoot, H.Y. Tai, S.C. Brandon, and R.L. Thomas: Production of microbiologically stable apple juice by metallic membrane ultrafiltration. *J. Food Sci.*, 54, 408-411, (1989)
18. Zer Ran Yu and Been Huang Chiang: Passion fruit juice concentration by ultrafiltration and evaporation. *J. Food Sci.*, 51, 1501-1505, (1986)
19. E. Hernandez, R. Couture, R. Rouseff, C.S. Chen, and S. Barros: Evaluation of ultrafiltration and adsorption to debitter grapefruit juice and grapefruit pulp wash. *J. Food Sci.*, 57, 664-666, (1992)
20. L.R. Fukumoto, P. Delaquis and B. Girard: Microfiltration and Ultrafiltration ceramic membranes for apple juice clarification. *J. Food Sci.*, 63, 845-850, (1998)
21. A. Mannheim and M. Cheryan: Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J. Food Sci.*, 55, 381-390, (1990)

22. L.L. Diosday, Y-M. Tzeng, and L.J. Rubin: Preparation of rapeseed protein concentrates and isolates using ultrafiltration. *J. Food Sci.*, 49, 768-770, (1984)
23. B.H. Chiang, C.K. Su, G.J. Tsai, and G.T. Tsao: Egg white lysozyme purification by ultrafiltration and affinity chromatography. *J. Food Sci.*, 58, 303-306, (1993)
24. D.A. Lonergan: Isolation of casein by ultrafiltration and cryodestabilization. *J. Food Sci.*, 48, 1817-1821, (1983)
25. Monique Lacroix, Jean Amiot, and Germain J. Brisson: Hydrolysis and Ultrafiltration treatment to improve the nutritive value of rapeseed proteins. *J. Food Sci.*, 48, 1644-1645, (1983)
26. Kenvin A. Sims and Munir Cheryan: Continuous production of glucose syrup in an ultrafiltration reactor. *J. Food Sci.*, 57, 163-166, (1992)
27. Wen Shiuh Kuo and Been Huang Chiang: Recovery of glutamic acid from

fermentation broth by membrane processing. *J. Food Sci.*, 52, 1401-1404, (1987)

28. Been Huang Chiang and Wan Der Pan: Ultrafiltration and Reverse osmosis of the waste water from sweet potato starch process. *J. Food Sci.*, 51, 971-974, (1986)