

<과제구분 : 공동연구>

과제구분	어젠다		수행시기	전반기	
연구과제 및 세부과제	연구분야 (Code)	수행 기간	과제책임자 및 세부책임자		
토종 농산물과 식물자원의 기능성 탐색 및 이용기술 개발	물질소재 (LS1005)	'09~'11	국립농업 과학원	박동식	
7) 산채류로부터 항비만 활성소재 및 상품개발	물질소재 (LS1005)	'09~'11	강원도원 농산물이용 시험장	김경희	
색인용어	토종 농산물, 식물자원, 생리활성탐색				

## ABSTRACT

### Screening and utilization of functional wild vegetables

We investigated  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activity of extracts collected from wild edible plants in Gangwon-do. 90 wild edible plants were collected and their water and ethanol extracts were obtained. Results of measuring enzyme inhibitory activity were selected 6 species wild edible plant ethanol extract. We investigated the anti-obesity activity of 6 species wild edible plant ethanol extract on the high fat diet supplied rat. and the result was selected *Lythrum salicaria* L. and *Aceriphyllum rossii*. We selected optimal combination ration and dose of *Lythrum salicaria* L. and *Aceriphyllum rossii* by animal experiment. In order to development bioactive materials for health functional foods, functional ingredients of *Lythrum salicaria* L. and *Aceriphyllum rossii* were established. We isolated the anti-obesity active compound orientin and cyanidin-3-monoglucoside by *Lythrum salicaria* L.

### 1. 연구목표

강원도 자생 산채 추출물의 항비만 기능성 및 생리활성물질 탐색으로 항비만 활성을 가진 자생 산채를 선별하여 비만관련 상품을 개발하는데 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 강원도 자생 산채 추출물의 $\alpha$ -amylase, $\alpha$ -glucosidase, lipase 효소 저해활성 탐색

#### 1) 시료 조제

본 실험에 사용한 산채시료는 2008년 산채의 성체 시기(7월~9월)에 강원도 양구, 평창, 태백에서 수집하였다. 시료는 채취 후 세척하였고, 동결건조(PVTFD10R, Ilshin, Yangju, Korea)하여 사용하였다. 시료 추출 용매는 물과 에탄올을 사용하였다. 물 추출은 산채 분말 시료 20 g에 1차 증류수 200 ml를 첨가하여 60°C에서 6시간 동안 초음파추출기(8510R-DTH, Branson, Danbury, CT, USA)를 이용하여 2회 추출하였다. 추출물은 여과지(No. 2, Whatman, Maidstone, England)가 깔려있는 Buchner funnel을 통과시켜 잔재물을 제거한 후 감압여과 하여 rotary vacuum evaporator (N-21NS, EYELA, Tokyo, Japan)로 완전히 농축하였다. 농축이 완료된 후 건조물은 증류수 10 ml를 첨가하여 용해시킨 후, 동결건조 하여 -20°C의 냉동고에 보관하면서 사용하였다. 에탄올 추출은 산채 분말 시료 20 g에 에탄올 200 ml를 첨가하여 상온에서 120 rpm의 진탕기에서 12시간 동안 2회 추출하였다. 농축 후 시료 제조 과정은 다음과 같다.

#### 2) $\alpha$ -Amylase 저해활성

$\alpha$ -Amylase의 저해활성(Fuwa, 1954)은 5 g의 agar와 5 g의 가용성 전분을 500 ml 증류수에 녹여 멸균한 후, 15 ml씩 분주하여 plate를 제조하였다. 10 mg/ml 농도의 산채 추출물과 200 Unit/ml 농도의  $\alpha$ -amylase(porcine pancreas, Sigma, St Louis, MO, USA)를 혼합하여 항생물질 검정용 여과지(paper disc, Advantec, Tokyo, Japan) 위에 각각 분주하여 평판배지 위에 올려놓고 37°C에서 3일간 배양한 후, I<sub>2</sub>/KI(5 mM I<sub>2</sub> in 3% KI) 5 ml를 가하여 15분간 발색시킨 후 면적의 측정은 clear zone의 반지름을 측정하여  $\pi r^2$ 로 계산하여 다음의 식으로 저해율을 계산하였다(Houghton and Soumyanath, 2006). 대조구로는 acarbose를 사용하였으며, 시료와 같은 농도로 제조하여 측정하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{\text{대조구의 면적} - \text{반응구의 면적}}{\text{대조구의 면적}} \times 100$$

#### 3) $\alpha$ -Glucosidase 저해활성

$\alpha$ -Glucosidase 저해활성(Wang *et al.*, 2006)은 10 mg/ml 농도의 산채 추출물과 0.15 U/ml  $\alpha$ -glucosidase 효소액 50  $\mu$ L 및 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 360  $\mu$ L를 혼합하여 405 nm에서 흡광도를 측정한 다음, 5분간 실온에서 유지하고 5 mM 4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside(pNPG) 50  $\mu$ l를 가하여 실온에서 10분간 더 반응시킨 뒤 동일한 파장에서 흡광도를 측정하였고, 흡광도의 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다.

#### 4) Pancreatic lipase 저해능 측정

Lipase 저해활성(Kim *et al.*, 2006)은 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 200 mM NaCl이 포함된 5% gum

arabic 용액 9 ml에 tributylin 1 ml을 섞어 초음파추출기로 유화시킨 후, 2%(w/v) agar와 혼합하여 고체평판배지를 제조하였다. 약 5 mm 정도 두께의 고체평판배지에 지름 6 mm의 구멍을 뚫어 10 mg/ml의 농도로 준비한 추출물과 pancreatic lipase(Sigma) 용액을 1:1의 비율로 3분간 반응시킨 혼합액을 넣고 24시간 동안 37°C에서 반응시킨 후, 효소에 의해 가수분해 되는 저해면적(clear zone)의 크기를 측정하여 pancreatic lipase에 대한 저해활성을 확인하였다.

### 5) 지방세포분화억제 측정

전지방세포(preadipocyte)인 3T3-L1 세포를 배양액을 이용하여 5%로 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 온도는 37°C로 배양하였다. 세포 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제(antibiotics)가 포함되는 Dulbecco's modified media(DMEM)를 사용하였다. 2~3일 간격으로 배양세포 표면을 인산완충염용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 세척한 후 0.5% 트립신(trypsin)을 넣고 처리하여 세포를 탈착시켜 계대배양하였다. 세포를 개별 실험에 사용할 때는 분화유도물질인 인슐린 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), dexamethasone(DEX, 0.25  $\mu\text{M}$ ), 1-methyl-3-methylxanthine (MIX, 0.5 mM)이 함유된 분화유도 배양액으로 교환하여 1~3일간 배양하여 지방세포로 분화를 유도하였다. 배양 3일 후 인슐린만 함유하는 배지로 2~3일간 배양한 후 인슐린을 제거한 배양액으로 바꾸었다. 추출물 처리는 분화유도 전 혹은 분화유도 후에 처리하였다. 전지방세포인 3T3-L1 세포는 10~15일간 배양하면 50~70% 이상의 세포가 분화되어 성숙된 지방세포로 변할 때 세포의 형태를 관찰하여 세포 모양이 둥글어지고 세포질이 지방으로 꽉 찬 정도를 광학현미경으로 관찰하여 지방분화를 측정하였다. 지방세포 수는 세포 배양판에 붙어 있는 세포를 수습하여 현미경을 이용하여 헤마사이토미터로 세포수를 측정하였다. 지방세포로 분화된 세포내의 지방을 염색하여 분화정도를 측정하는 Oil-Red-O 염색법은 세포를 7% 포름알데하이드가 포함된 인산완충염용액으로 1시간 동안 고정시킨 후 PBS로 세척한 후 세포를 1% Oil-Red-O가 있는 99% 이소프로판올 액으로 10분간 염색하였다. 세포질내 붉은색 과립이 있는 세포를 분화된 지방세포로 간주하고, 광학현미경으로 관찰하면서 헤마사이토미터로 세포수를 측정하였다. 염색된 Oil-Red-O를 이소프로판올로 녹여내어 510 nm에서 흡광도를 측정하여 지방세포의 분화정도를 측정하였다.

## 나. 유망산채 선발 및 유망산채의 조성비율과 용량결정시험(동물실험)

### 1) 실험재료

본 실험에 사용한 모든 시료는 나. 1)의 시료와 동일한 시료를 사용하였다.

### 2) 실험동물 및 사육 환경

실험동물은 Sprague Dawley(SD)계 4주령 웅성 흰쥐를 (주)오리엔트바이오에서 구입하여 1주일간 rat용 일반사료(5L79 PMI Inc., St. Louis, USA)로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간 동안 실험동물은 50%±5%, 온도 24±2°C 유지되는 동물 실험실에서 사육하였으며, 물과 사료는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급하였다. 본 동물실험은 강원도 농업기술원 동물실험윤리위원회의 승인을 거쳐 진행하였다.

### 3) 실험군 분리 및 식이

1주일간 실험실에서 적응된 실험동물을 난괴법(randomized block design)에 따라 각 처리군당 10마리씩 총 4군으로 나누어 실험에 사용하였고, 군 분리, 투여물질, 투여물질의 용량은 표 1과 같다. 동물실험에 사용된 식이는 미국 영양학회(American Institute of Nutrition, AIN, USA)가 추천하는 AIN-93G 사료를 구입하여 사용하였다(Reeves *et al.*, 1993). 정상식이는 탄수화물 : 지방 : 단백질의 비율을 열량 기준으로 63 : 16 : 20 으로 구성하였고, 고지방 식이는 34 : 45 : 20으로 구성하였다. 고지방 식이는 돈지를 공급하여 지방함량이 총열량의 45%가 되도록 하였다. 군 분리 후 정상군에는 AIN 93G 사료를 섭취시켰고, 대조군과 시험물질 투여군, 양성대조군(가르시니아 투여군, 중외제약)에는 고지방 식이를 시험 개시일부터 시험 종료시점인 6주간 자유 급여 방법으로 공급하였으며, 시험물질 투여군과 양성대조군은 8주 동안 시험 물질을 경구 투여하였다. 정상식이와 고지방식이의 조성은 표 1과 같다.

표 1. 사료 조성비

	HFD		Regular diet	
	g%	kcal%	g%	kcal%
Protein	23	20	20	20
Carbohydrate	40	34	63	63
Fat	24	45	7	16
Ingredient				
Casein	200	800	200	800
Sucrose	172.8	691.2	100	400
Dextrose	100	400	132	528
Corn starch	72.8	291.2	397.5	1,590
Cellulose	50	0	50	0
Soybean oil	25	225	70	630
Lard	177.5	1,597.5	0	0
Mineral mixture <sup>1)</sup>	45	0	35	0
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	10	40	10	40
L-Cystine	3	12	3	12
Choline bitartrate	2	0	2.5	0
Total	858.1	4,056.9	1,000	3,902

1) AIN-93G mineral mix., ICN biochemical, USA

2) AIN-93G vitamin mix., ICN biochemical, USA

동물실험은 유망산채 선발(표 2), 선발된 산채 2종의 혼합비율 선정(표 3) 및 재현성 평가(표 4), 혼합비율이 결정된 산채 2종의 용량결정(표 5) 및 재현성 평가(표 6)로 나누어 수행되었다.

표 2. 유방산채 선발 시험의 실험군 분리

Experimental group	Diet	Treatment chemical	mg/kg body weight
Normal	AIN-93G	-	-
Control	HFD <sup>1)</sup>	-	-
Treatment 1	HFD	기린초	250
Treatment 2	HFD	까치수염	250
Treatment 3	HFD	털부처꽃	250
Treatment 4	HFD	돌단풍	250
Treatment 5	HFD	생강나무	250
Treatment 6	HFD	산마늘	250
Positive control	HFD	Garcinia Cambogia extracts	166

1) HFD: high fat diets

표 3. 선발된 털부처꽃과 돌단풍의 조성비율 결정 시험의 실험군 분리

Experimental group	Diet	Treatment chemical	mg/kg body weight
Normal	AIN-93G	-	-
Control	HFD <sup>1)</sup>	-	-
Treatment 1	HFD	LSE <sup>2)</sup> (100)	250
Treatment 2	HFD	LSE : ARE <sup>3)</sup> (70:30)	250
Treatment 3	HFD	LSE : ARE (50:50)	250
Treatment 4	HFD	LSE : ARE (30:70)	250
Treatment 5	HFD	ARE (100)	250
Positive control	HFD	Garcinia Cambogia extracts	166

1) HFD: high fat diets

2) LSE : *Lythrum salicaria* L. Ethanol Extract

3) ARE: *Aceriphyllum rossii* Ethanol Extract

표 4. 털부처꽃과 돌단풍의 조성비율 재현성 평가의 실험군 분리

Experimental group	Diet	Treatment chemical	mg/kg body weight
Normal	AIN-93G	-	-
Control	HFD <sup>1)</sup>	-	-
Treatment 1	HFD	LSE : ARE <sup>3)</sup> (70:30)	250
Treatment 2	HFD	LSE : ARE (50:50)	250
Positive control	HFD	Garcinia Cambogia extracts	166

1) HFD: high fat diets

2) LSE : *Lythrum salicaria* L. Ethanol Extract

3) ARE: *Aceriphyllum rossii* Ethanol Extract

표 5. 털부처꽃과 돌단풍의 혼합물의 용량결정 평가의 실험군 분리

Experimental group	Diet	Treatment chemical	mg/kg body weight
Normal	AIN-93G	-	-
Control	HFD <sup>1)</sup>	-	-
Treatment 1	HFD	MIX <sup>2)</sup>	375
Treatment 2	HFD	MIX	250
Treatment 3	HFD	MIX	125
Positive control	HFD	Garcinia Cambogia extracts	166

1) HFD: high fat diets

2) MIX : mixture of Ethanol Extract of *Lythrum salicaria* L. and *Aceriphyllum rossii*

표 6. 털부처꽃과 돌단풍의 혼합물의 용량결정 재현성 평가의 실험군 분리

Experimental group	Diet	Treatment chemical	mg/kg body weight
Normal	AIN-93G	-	-
Control	HFD <sup>1)</sup>	-	-
Treatment 1	HFD	MIX <sup>2)</sup>	375
Treatment 2	HFD	MIX	250
Treatment 3	HFD	MIX	125
Positive control	HFD	Garcinia Cambogia extracts	166

1) HFD: high fat diets

2) MIX : mixture of Ethanol Extract of *Lythrum salicaria* L. and *Aceriphyllum rossii*

#### 4) 체중 및 식이섭취량의 변화

체중, 음수섭취량 및 사료섭취량은 시험 개시일과 개시 후 매주 1회 간격으로 측정하였다.

#### 5) 혈액 채취 및 혈액생화학적 검사

혈액 채취는 시험 물질 투여 3주 후에 ether 흡입 마취 후 안와 정맥에서 1.2~1.5 ml을 채취하였으며, 시험 종료일에는 Zoletil : Rumpun(4:1)으로 마취(복강주사 50 µL/100g body weight) 후 복대정맥에서 2 ml 채혈하여 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 그 다음 상등액을 취하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청 중 total cholesterol, triglyceride, HDL(high density lipoprotein-cholesterol, LDL(low density lipoprotein)-cholesterol를 자동 혈청분석기(BT1000, Biotechnical Instrument, Rome, Italy)를 이용하여 분석하였다.

#### 6) 장기중량 및 지방조직 무게 측정

시험 종료일 복대정맥 채혈 후 방혈을 실시하였으며 간 중량, 부고환 지질 중량, 복강 내의 지방세포 조직의 중량을 측정하기 위해 적출하였으며 흡수지에 체액 및 혈액을 제거 후 각각의 중량을 측정하였다.

## 7) 통계처리

실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS(statistical package for social sciences, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

### 다. 털부처꽃과 돌단풍 잎 에탄올 추출물의 항비만 활성 탐색

#### 1) 시료 조제

본 실험에 사용한 시료는 2009년 5월 털부처꽃과 돌단풍 지상부를 강원도 양구 대암산에서 수집하여 동결건조(PVTFD10R, Ilsinbiobase, Yangju, Gyeonggido, Korea)하여 마쇄 후 사용하였다. 시료 추출 용매는 물과 에탄올을 사용하였다. 추출방법은 가. 1)의 방법으로 수행하였다.

#### 2) 항비만 활성 측정

항비만 활성 검정은 pancreatic lipase의 활성 억제 측정과 지방세포 분화 억제능을 측정하였으며, 실험방법은 가. 4)와 5)의 방법으로 수행하였다.

### 라. 털부처꽃과 돌단풍의 지질대사

#### 1) 실험재료

본 실험에 사용한 모든 시료는 나. 1)의 시료와 동일한 시료를 사용하였다.

#### 2) 실험동물 및 사육 환경

유전적으로 비만을 유도시킨 9주령 Zucker fatty 흰쥐(fa/fa) 7마리를 미국 Harlan Sprague Dawely Inc. 사로부터 구입하여 일주일간 적응기간을 두었다. 동물 사육실 실험조건은 온도 21~26°C, 습도 45~55%로 유지 시켰으며, 조명은 12시간 간격으로 조절하였으며, 물과 사료는 자유롭게 먹도록 하였다. 일주일 후 Avertin(0.8 mg/g)(Oh *et al.*, 2009)을 복강 투여하여 마취 시킨 후 복부를 절개하여 간조직을 적출하였으며 효소 활성 측정을 위한 효소원 제조를 위해 사용하였다.

#### 3) 효소 활성 측정을 위한 효소원 제조

간 조직 3g을 적출하여 buffer A (0.25 M sucrose, pH 7.4)를 이용하여 혈액 및 이물질을 씻어서 제거한 뒤 buffer B(150 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-mercapto ethanol)를 8배하여 균질기를 이용하여 900 rpm에서 5분간 균질하였다. 균질액을 600 Xg (Hanil, MF600)에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 취한 뒤 다시 buffer B를 넣고 8,000 Xg (Beckman, JA-20)에서 10분간 원심분리 하여 침전물을 제거하였고 상등액을 105,000 Xg (Beckman, 70Ti)에서 70분간 원심분리 하여 상등액을 취하여 cytosol 분획물로 사용하였다. LPL과 CAT는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 enzyme solution을 구입하여 사용하였다.

#### 4) Lipoprotein lipase(LPL) 활성 측정

Lipoprotein lipase의 활성측정은 Quinn 등의 방법(Quinn *et al.*, 1982)으로 측정하였다. Reagent A (100 mM sodium phosphate buffer with 150 mM Sodium chloride and

0.5%(v/v) Triton X-100, pH 7.2 at 37°C) 800 $\mu$ l에 sample 100 $\mu$ l을 넣고 fraction하여 얻은 lipoprotein lipase enzyme solution 100 $\mu$ l와 Reagent C[50 mM p-Mitrophenyl Butyrate(PNPB) in Reagent B] 10  $\mu$ l로 발색시켜 570 nm에서 비색 정량하여 lipoprotein lipase의 활성을 측정하였다. Lipoprotein lipase활성은 아래 계산식에 의해 Units/mg protein으로 나타내었다.

$$\text{Units enzyme} = \frac{\Delta A_{400\text{nm}/\text{min Test}} - \Delta A_{400\text{nm}/\text{min Blank}}(1.01)(\text{df})}{(0.0148)(0.1)}$$

1.01 = Volume(in milliliters) of assay

Df = Dilution factor

0.0148 = Micromolar extinction coefficient of P-Nitrophenol at 400nm

0.1 = Volume of enzyme used

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{Units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

### 5) Acyl-CoA synthetase(ACS) 활성 측정

Acyl-CoA synthetase(ACS)의 활성측정은 Shimizu의 방법으로 측정하였다(Shimizu *et al.*, 1979). E-tube에 Reagent A(200 mM Tris Buffer with 20 mM Magnesium Chloride, 2 mM Ethlenediaminetetraacetic Acid(EDTA) and 0.25 %(w/v) triton X-100(pH 8.1 at 25°C) 900  $\mu$ l, sample 10  $\mu$ l, Reagent C(14.5 mM Adenosine 5'-Triphosphate solution(ATP)) 25  $\mu$ l, Reagent D (42.7mM Phospho(enol) Pyruvate solution(PEP) in Reagent B) 25  $\mu$ l, Reagent E(72 units/ml Myokinase Enzyme solution(MK) in Reagent B) 25  $\mu$ l, Reagent F(120 units/ml of PK/LDH Mixed Enzymes in Reagent B) 25  $\mu$ l, Reagent G(49 mM Coenzyme A(CoA) in Reagent B) 50  $\mu$ l, Reagent H(5.3 mM  $\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, Reduced Form Solution( $\beta$ -NADH))를 넣고 잘 섞은 후 cytosol 100  $\mu$ l와 Reagent J(0.98 mM sodium oleic solution in Reagent I) 100  $\mu$ l를 넣고 섞은 후 큐벳에 옮겨 340 nm에서 15분 동안 NADH의 산화를 통하여 Acyl-CoA synthetase의 활성을 측정하였다. Acyl-CoA synthetase 활성은 아래 계산식에 의해 Units/mg protein으로 나타내었다.

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}/\text{min Test}} - \Delta A_{340\text{nm}/\text{min Blank}}(2.8)(\text{df})}{(2)(6.22)(0.2)}$$

2.8= Total volume(in milliliters) of assay

Df = Dilution factor

2 = 2 mole of  $\beta$ -NAD produced per mole of oleate used

6.22 = Millimolar extinction coefficient of  $\beta$ -NADH at 340nm

0.2 = Volume of enzyme used

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{Units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{Units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

## 6) Carnitine acyltransferase(CAT) 활성 측정

Carnitine acetyl transferase의 활성측정은 Bergmyer의 방법으로 측정하였다(Bergmeyer *et al.*, 1974). E-tube에 Reagent A(100 mM Tris-HCl Buffer pH 8.0 at 25°C), Reagent B(11 mM Coenzyme A), Reagent C(83.4 mM Acetyl-DL-Carnitine)를 충분히 섞은 후 650  $\mu\text{l}$ 을 큐벳에 넣고 sample 10  $\mu\text{l}$ 와 Carnitine acetyl transferase Enzyme solution (0.6 units/ml) 50  $\mu\text{l}$ 을 넣은 후 233 nm에서 5분간 측정하면서 Carnitine acetyl transferase의 활성을 측정하였다. Carnitine acetyl transferase활성은 아래 계산식에 의해 Units/mg protein으로 나타내었다.

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{\Delta A_{233\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{233\text{nm}}/\text{min Blank}}{(2)(6.22)(0.2)}(3)(\text{df})$$

3= Total volume(in milliliters) of assay

Df = Dilution factor

4.5 = Millimolar extinction coefficient of Acetyl-CoA at 233nm

0.1 = Volume of enzyme used

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{Units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{Units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

## 7) 통계처리

실험 결과는 평균값과 표준오차로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (statistical package for social sciences, version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 검증 하였다.

### 마. 털부처꽃과 돌단풍의 지표성분 설정 및 시기별 성분과 활성 비교

#### 1) 실험재료

털부처꽃과 돌단풍을 2010년 2월 23일 파종하여 72일간 육묘한 묘를 강원도농업기술원 농산물이용시험장 시험포장에 5월 6일 8×10 cm 간격으로 정식하였고, 월동 후 2011년 5월에서 7월까지 30일 간격으로 채취하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 지표성분 설정 및 성분 분석

털부처꽃과 돌단풍에 함유되어 있는 표준품을 구입하여 성분함량이 높고, 분석이 용이한 물질을 선별하였다. 분석기기는 Waters사의 Autopurification 시스템을 사용하여 분석하였다.

#### 3) 항비만 활성 검정

항비만 활성 검정은 pancreatic lipase의 활성 억제로 검정하였으며, 실험방법은 가. 4) 방법으로 수행하였다.

## 바. 털부처꽃으로부터 항비만 활성물질의 분리

### 1) 실험재료

강원도농업기술원 농산물이용시험장 시험포장에서 재배된 털부처꽃을 생식생장전에 수확하여 위 실험방법인 가. 1)의 방법대로 추출하여 사용하였다.

### 2) 유기용매를 이용한 분획물 조제

털부처꽃 에탄올 조추출물을 d-H<sub>2</sub>O에 현탁시킨 후 용매의 극성에 따라 분획하여 n-hexane layer, dichloromethane layer, ethyl acetate layer, n-butanol layer 및 d-H<sub>2</sub>O layer 을 얻고 감압 농축하여 각각의 용매별 수율을 측정하였으며, -20℃의 냉동고에 보관하면서 분리·정제를 위한 시료로 사용하였다.

### 3) 선발된 분획층으로부터 항비만 활성물질의 분리

항비만 활성이 우수한 털부처꽃 BuOH 분획층을 medium pressure liquid chromatography system(Buchi 620, Switzerland)을 사용하여 분리하였다. ODS gel이 충전되어 있는 15 × 230 mm glass column (Buchi 620, Switzerland)에 50,000ppm으로 조제한 털부처꽃 BuOH 분획물 1.5ml을 주입하여 분당 2 ml씩 표 7의 조건으로 용출시켜 UV detector를 이용하여 흡광도 254 nm에서 측정하였다.

표 7. 털부처꽃 BuOH 분획물의 분리조건

Instrument	Medium pressure liquid chromatograph			
Collector	Fraction Collector C-660			
Detector	Büchi UV Photometer C-635, Wavelength : 254 nm			
Flow rate	2.0 ml min <sup>-1</sup> (collect fractions of size 20 ml during entire run)			
Mobile phase	d-water, Acetonitrile, methanol			
	min	d-water	acetonitrile	methanol
	0	100	0	0
	5	100	0	0
	10	50	50	0
	15	0	100	0
	20	0	100	0
	0	0	100	0
	5	0	100	0
Gradient	10	0	80	20
	15	0	80	20
	20	0	60	40
	25	0	60	40
	30	0	40	60
	35	0	40	60
	40	0	20	80
	45	0	20	80
	110	0	0	100

MPLC로 1차 분리된 분획물의 항비만활성검정을 통하여 선발된 분획물 BD를 10mg/ml의 농도로 조제하여 표 8의 조건으로 Waters사의 Autopurification 시스템을 사용하여 분리하였다.

표 8. 털부처꽃 BD 분획물의 분리조건

Classification	Condition		
Instrument	Waters autopurification system (Waters, USA)		
	Waters 3100 single mass system (Waters, USA)		
Column	SunFire™ C <sub>18</sub> (19 × 150 mm, 5 μm)		
Mobile phase	Eluent A: d-water		
	Eluent B: Acetonitrile		
Injection volume	400 μl		
Detector	3100 single mass		
	2998 Photodiode Array Detector		
Run time	40 min		
Mode	Positive		
Capillary (V)	2	LM 1 Resolution	15
Extractor (V)	3	HM 1 Resolution	15
RF lens (V)	0.1	Ion Energy	1
Cone (V)	50	Gain	1
Source temp °C	150	Desolvation gas flow(L/hr)	650
Desolvation temp °C	350	Cone gas flow(L/hr)	50

Gradient table

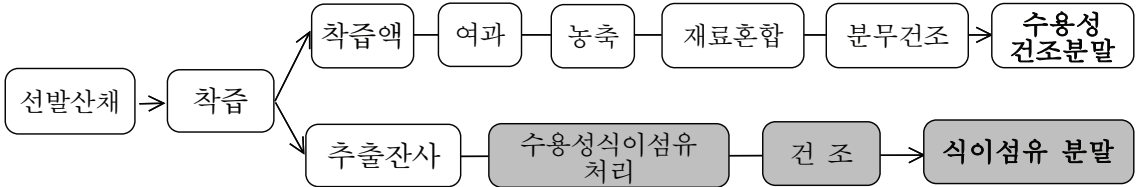
Time	Flow rate	%A	%B
initial	17	95	5
10	17	95	5
20	17	85	15
30	17	80	20
35	17	75	25
37	17	85	15
40	17	95	5

#### 4) 항비만 활성

항비만 활성 검정은 pancreatic lipase의 활성 억제로 검정하였으며, 실험방법은 가. 4) 방법으로 수행하였다.

### 사. 산채 활용도 증진을 위한 분말화 연구

참취를 블렌칭 처리에 따라 착즙하고 압착여과한 후 rotary evaporator를 이용하여 감압농축한 후 덱스트린과 아라비아검의 비율을 달리하여 혼합한후 분무건조하여물에 용해되는 분말을 제조하였다.



### 아. 산채 잔사 활용 쿠키 제조

털부처꽃과 돌단풍 에탄올 추출 후 남은 잔사(1:1 혼합)와 털부처꽃과 돌단풍의 건체(1:1 혼합)의 재료 특성을 파악하기 위하여 일반 쿠키제조법에 잔사와 건체 혼합물을 2, 5, 10% 씩 첨가하여 쿠키를 제조하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 가. 강원도 자생 산채 추출물의 $\alpha$ -amylase, $\alpha$ -glucosidase, lipase 효소 저해활성 탐색

산채 90종(표 9)의 가식부위별과 용매별(물, 에탄올)로 추출하여  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase 효소 저해활성을 탐색하여, 각각 효소의 저해활성이 높은 식물을 선발하였다.

표 9. 산채 90종의 식물명

Sample No.	과명	학명
1	Actinidiaceae	<i>Actinidia arguta</i> (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq. var. <i>arguta</i>
2	Araliaceae	<i>Kalopanax septemlobus</i> (Thunb. ex Murray) Koidz.
3	Araliaceae	<i>Aralia elata</i> (Miq.) Seem.
4	Araliaceae	<i>Aralia cordata</i> Thunb.
5	Araliaceae	<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr. & Maxim.) Maxim.
6	Araliaceae	<i>Eleutherococcus gracilistylus</i> (W.W.Sm.) S.Y.Hu
7	Araliaceae	<i>Eleutherococcus divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i> (Nakai) C.H.Kim & B.Y.Sun
8	Aspleniaceae	<i>Athyrium yokoscense</i> (Franch. & Sav.) H.Christ
9	Boraginaceae	<i>Symphytum officinale</i> L.
10	Campanulaceae	<i>Codonopsis lanceolata</i> (Siebold & Zucc.) Trautv.
11	Campanulaceae	<i>Adenophora remotiflora</i> (Siebold & Zucc.) Miq.
12	Campanulaceae	<i>Campanula takesimana</i> Nakai
13	Campanulaceae	<i>Asyneuma japonicum</i> (Miq.) Briq.
14	Campanulaceae	<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>japonica</i> (Regel) H.Hara

Sample No.	과명	학명
15	Chloranthaceae	<i>Chloranthus japonicus</i> Siebold
16	Compositae	<i>Saussurea macrolepis</i> (Nakai) Kitam.
17	Compositae	<i>Saussurea pulchella</i> (Fisch.) Fisch.?
18	Compositae	<i>Ligularia stenocephala</i> (Maxim.) Matsum. & Koidz.
19	Compositae	<i>Cirsium setidens</i> (Dunn) Nakai
20	Compositae	<i>Taraxacum ohwianum</i> Kitam.
21	Compositae	<i>Ainsliaea acerifolia</i> Sch.Bip.
22	Compositae	<i>Carpesium abrotanoides</i> L.
23	Compositae	<i>Synurus palmatopinnatifidus</i> var. <i>indivisus</i> (Makino) Kitam.
24	Compositae	<i>Petasites japonicus</i> (Siebold & Zucc.) Maxim.
25	Compositae	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>asiatica</i> Kitam. ex Hara var. <i>asiatica</i>
26	Compositae	<i>Parasenecio auriculata</i> var. <i>matsumurana</i> Nakai
27	Compositae	<i>Hieracium umbellatum</i> L.
28	Compositae	<i>Rhaponticum uniflorum</i> (L.) DC.
29	Compositae	<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.
30	Compositae	<i>Lactuca raddeana</i> Maxim.
31	Compositae	<i>Atractylodes japonica</i> KOIDZ.
32	Compositae	<i>Saussurea grandifolia</i> Maxim.
33	Compositae	<i>Taraxacum officinale</i> Weber
34	Compositae	<i>Aster yomena</i> (Kitam.) Honda
35	Compositae	<i>Cirsium japonicum</i> var. <i>maackii</i> (Maxim.) Matsum.
36	Compositae	<i>Syneilesis palmata</i> (Thunb.) Maxim.
37	Compositae	<i>Crepidiastrum denticulatum</i> (Houtt.) Pak & Kawano
38	Compositae	<i>Artemisia dubia</i> Wall.
39	Compositae	<i>Solidago virgaurea</i> subsp. <i>gigantea</i> (Nakai) Kitam.
40	Compositae	<i>Achillea alpina</i> L.
41	Compositae	<i>Taraxacum coreanum</i> Nakai
42	Compositae	<i>Sonchus oleraceus</i> L.
43	Compositae	<i>Aconogonon alpinum</i> (All.) Schur
44	Compositae	<i>Ixeridium dentatum</i> (Thunb. ex Mori) Tzvelev
45	Crassulaceae	<i>Sedum kantschaticum</i> Fisch. & Mey.
46	Crassulaceae	<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge
47	Cruciferae	<i>Cardamine komarovii</i> Nakai for. <i>komarovii</i>
48	Ericaceae	<i>Rhododendron brachycarpum</i> D.Don ex G.Don
49	Euphorbiaceae	<i>Securinega suffruticosa</i> (Pall.) Rehder
50	Guttiferae	<i>Hypericum erectum</i> Thunb.
51	Labiatae	<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i> Nakai
52	Lauraceae	<i>Lindera obtusiloba</i> Blume var. <i>obtusiloba</i>
53	Leguminosae	<i>Vicia unijuga</i> A.Braun
54	Leguminosae	<i>Crotalaria sessiliflora</i> L.

Sample No.	과명	학명
55	Liliaceae	<i>Hemerocallis dumortieri</i> Morren
56	Liliaceae	<i>Hosta longipes</i> (Franch. & Sav.) Matsum.
57	Liliaceae	<i>Hemerocallis fulva</i>
58	Liliaceae	<i>Smilacina japonica</i> A.Gray var. <i>japonica</i>
59	Liliaceae	<i>Erythronium japonicum</i> (Balrer) Decne.
60	Lythraceae	<i>Lythrum anceps</i> (Koehne) Makino
61	Malvaceae	<i>Hibiscus trionum</i> L.
62	Oleaceae	<i>Ligustrum obtusifolium</i> Siebold & Zucc.
63	Onagraceae	<i>Oenothera biennis</i> L.
64	Plantaginaceae	<i>Plantago asiatica</i> L.
65	Polygonaceae	<i>Bistorta major</i> S.F. Gray var. <i>japonica</i> Hara
66	Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L.
67	Primulaceae	<i>Lysimachia clethroides</i> Duby
68	Primulaceae	<i>Lysimachia vulgaris</i> var. <i>davurica</i> (Ledeb.) R.Kunth
69	Ranunculaceae	<i>Thalictrum aquilegifolium</i> var. <i>sibiricum</i> Regel & Tiling
70	Ranunculaceae	<i>Caltha palustris</i> L. var. <i>palustris</i>
71	Ranunculaceae	<i>Clematis terniflora</i> var. <i>mandshurica</i> (Rupr.) Ohwi
72	Ranunculaceae	<i>Clematis terniflora</i> DC.
73	Ranunculaceae	<i>Clematis trichotoma</i> Nakai
74	Rosaceae	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.
75	Rosaceae	<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.
76	Saxifragaceae	<i>Philadelphus schrenkii</i> Rupr. var. <i>schrenkii</i>
77	Saxifragaceae	<i>Mukdenia rossii</i> (Oliv.) Koidz.
78	Saxifragaceae	<i>Astilbe rubra</i> Hook.f. & Thomson var. <i>rubra</i>
79	Umbelliferae	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch. ex Hoffm.) Benth. & Hook.f. ex Franch. & Sav.
80	Umbelliferae	<i>Pleurospermum camtschaticum</i> Hoffm.
81	Umbelliferae	<i>Oenanthe javanica</i> (Blume) DC.
82	Umbelliferae	<i>Aegopodium podagraria</i> L.
83	Umbelliferae	<i>Heracleum moellendorffii</i> Hance
84	Umbelliferae	<i>Pimpinella brachycarpa</i> (Kom.) Nakai
85	Umbelliferae	<i>Angelica gigas</i> Nakai
86	Umbelliferae	<i>Cryptotaenia japonica</i> Hassk.
87	Umbelliferae	<i>Bupleurum falcatum</i> var. <i>scorzonerifolium</i> (Willd.) Ledeb.
88	Umbelliferae	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.
89	Valerianaceae	<i>Patrinia villosa</i> (Thunb.) Juss.
90	Valerianaceae	<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fisch. ex Trevir.

산채 90종의 물과 에탄올 추출물  $\alpha$ -amylase 저해활성을 측정된 결과,  $\alpha$ -amylase의 활성을 80% 이상 저해한 식물로 에탄올 추출물 3종- 싱아(*Aconogonon alpinum* (All.) Schur), 큰까치

수염(*Lysimachia clethroides* Duby), 좁쌀풀(*Lysimachia vulgaris* var. *davurica* (Ledeb.) R.Kunth), 물 추출물 3종 - 싱아, 큰까치수염, 돌단풍(*Mukdenia rossii*(Oliv.) Koidz.)이 선발되었다.

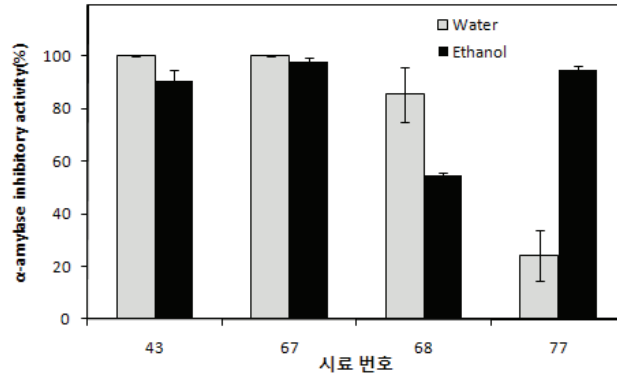


그림 1. 산채 추출물의 α-amylase 활성 저해 효과

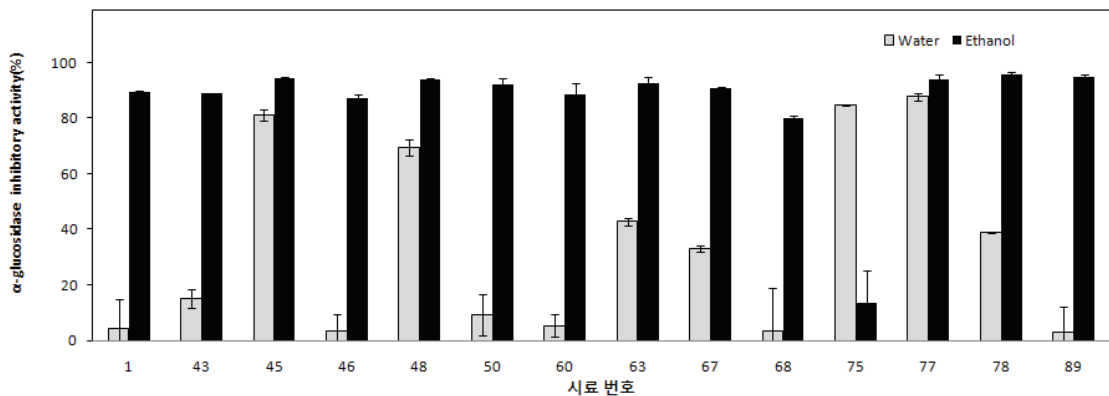


그림 2. 산채 추출물의 α-glucosidase 활성 저해 효과

산채 90종의 물과 에탄올 추출물 α-glucosidase 저해활성을 측정한 결과, α-glucosidase의 활성을 80%이상 저해한 식물로 에탄올 추출물 13종 - 다래나무(*Actinidia arguta* (Siebold & Zucc.) Planch. ex Miq. var. *arguta*), 싱아, 기린초(*Sedum kamtschaticum* Fisch. & Mey.), 돌나물(*Sedum sarmentosum*Bunge), 만병초(*Rhododendron brachycarpum* D.Don ex G.Don), 고추나물(*Hypericum erectum* Thunb.), 털부처꽃(*Lythrum salicaria* L.), 달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.), 큰까치수염, 좁쌀풀, 짚신나물(*Agrimonia pilosa*Ledeb.), 돌단풍, 노루오줌(*Astilbe rubra* Hook.f. & Thomson var. *rubra*), 뚝갈(*Patrinia villosa* (Thunb.) Juss.) 물 추출물 3종 - 기린초, 짚신나물, 돌단풍이 선발되었다.

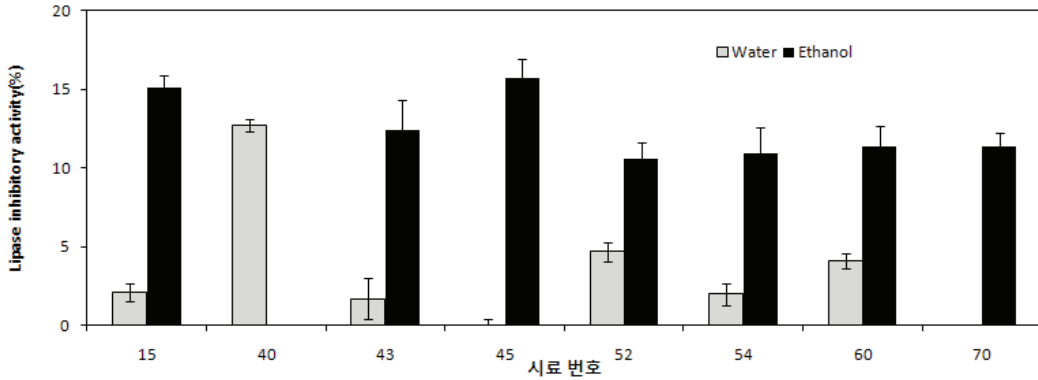


그림 3. 산채 추출물의 lipase 활성 저해 효과

산채 90종의 물과 에탄올 추출물 lipase 저해활성을 측정한 결과, lipase의 활성을 10%이상 저해한 식물로 에탄올 추출물 7종 -홀아비꽃대(*Chloranthus japonicus* Siebold), 싱아, 기린초, 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume var. *obtusiloba*), 활나물(*Crotalaria sessiliflora* L.), 털부처꽃, 동의나물(*Caltha palustris* L. var. *palustris*), 물 추출물 1종 -톱풀(*Achillea alpina* L.)이 선발되었다.

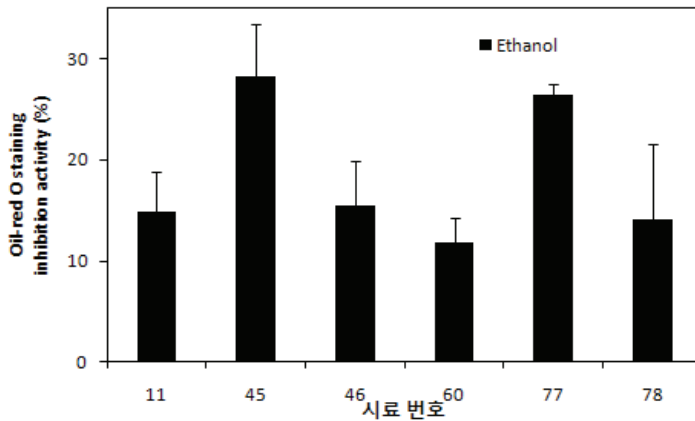


그림 4. 산채 추출물의 지방세포분화억제 효과

1차 선발된 유망 산채를 대상으로 지방세포 3T3-L1의 분화를 측정한 결과, 지방세포분화를 10%이상 저해한 식물로 에탄올 추출물 6종 - 기린초, 돌단풍, 털부처꽃, 모시대(*Adenophora remotiflora* (Siebold & Zucc.) Miq.), 돌나물, 노루오줌이 선발되었다.

#### 나. 유망산채 선발 및 유망산채의 조성비율과 용량결정시험(동물실험)

$\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase 효소 저해활성과 지방분화 억제능을 통해 선발된 식물 중 구하기 쉽고 식용이 가능한 산채로 최종 6종(기린초, 까치수염, 털부처꽃, 돌단풍, 생강나무, 산마늘)을 선발하였다. 선발된 유망산채 5종이 흰쥐(SD-Rat)의 지질대사에 미치는 영향

을 알아보고자 동물실험(T1: 기린초; T2: 큰까치수염, T3: 털부처꽃, T4: 돌단풍, T5: 생강나무, T6: 산마늘)을 실시하였다.

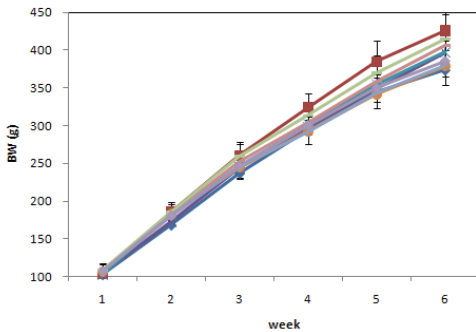


그림 5. 처리구별 체중 증가량

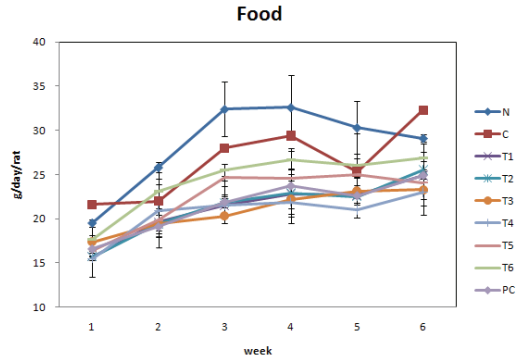


그림 6. 처리구별 식이섭취량

SD-rat을 대상으로 고지방식이와 동시에 유방산채 에탄올 추출물(250 mg/kg) 6주간 투여한 결과, 실험동물의 체중 증가량, 식이섭취량 모두 6종의 산채 추출물에서 대조군(C)보다 낮은 경향을 보였다.

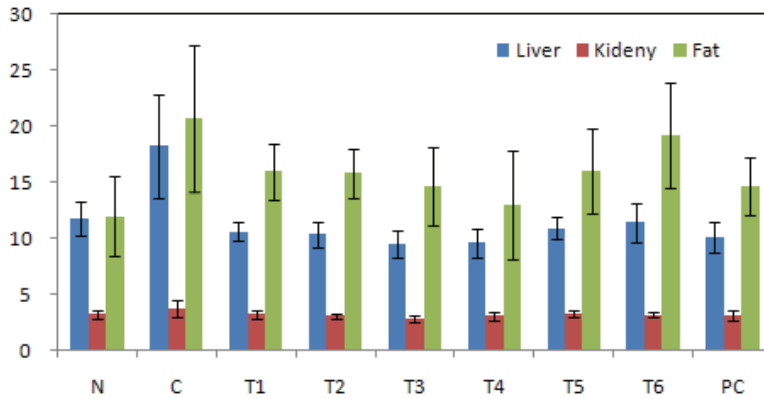


그림 7. 처리구별 장기무게

처리구별 장기무게를 측정된 결과, 산채 추출물 처리구 모두 간의 무게는 정상군(N)과 비슷했으며, 고지방식이만을 섭취한 대조군(C)과 비교했을시 간과 지방의 무게 모두 낮은 경향을 보였다. 고지방식이만을 실시한 대조군의 경우 총 복부지방의 중량은  $20.67 \pm 6.52\text{g}$ 으로 정상군(N,  $11.96 \pm 3.59\text{g}$ )에 비하여 약 1.8배가량 증가하여 고지방식이에 의한 복부지방조직의 형성이 촉진됨을 알 수 있었다. 산채추출물투여군 중 복부지방세포의 양이 가장 적은군은 돌단풍추출물투여군(T4)으로  $12.98 \pm 4.88\text{g}$ 이였고 다음으로는 털부처꽃 추출물투여군(T3)군이  $14.63 \pm 3.46\text{g}$ 의 중량을 나타냈으며 가르시니아 투여군과 유사하거나 낮은 값을 나타내었다.

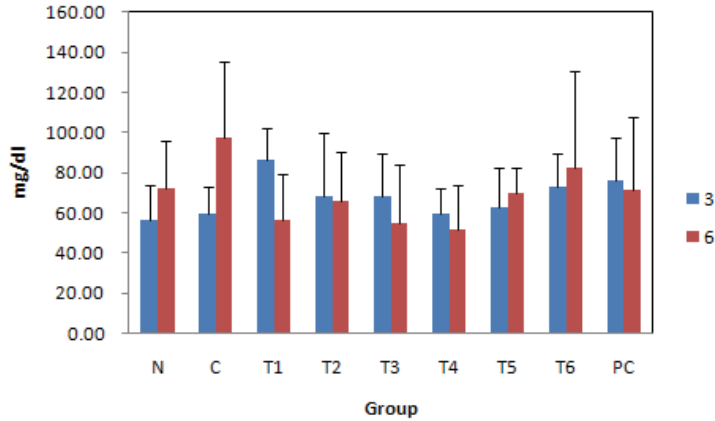


그림 8. 산채 추출물 처리구별 triglyceride 함량

시험물질 투여가 혈청 지질 농도에 미치는 영향을 알아본 결과, 총콜레스테롤의 변화는 고지방식이 급여가 이루어진 후에는 군간에 다소 차이를 보이지만 유의수준( $p < 0.05$ )이하의 변화였다. 그러나 6주후의 변화는 명확하게 나타나 정상군  $59.90 \pm 11.80$  mg/dl에 비하여 대조군의 혈중지질농도는  $73.80 \pm 11.79$  mg/dl로 증가하였음. 반면 산채추출물 투여군의 경우 큰까치수염추출물 투여군(T2)과 들단풍추출물의 투여군(T4)에서 가장 많은 감소를 보였다.

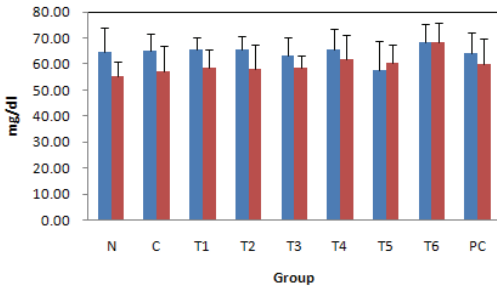


그림 9. 처리구별 HDL-콜레스테롤 함량

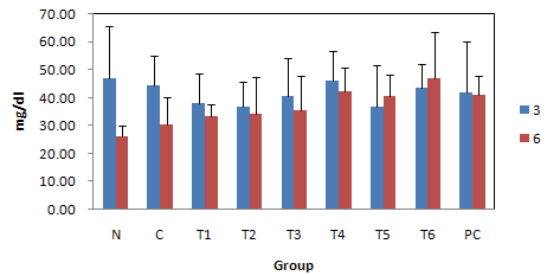


그림 10. 처리구별 LDL-콜레스테롤 함량

### 1) 털부처꽃, 들단풍 에탄올 추출물의 조합별 비교 평가(조합비율 결정)

털부처꽃, 들단풍 2종의 조성비에 따른 항비만 효과를 관찰하기 위하여, 고지방식이(High Fat diet 45% 사료를 6주간 투여)로 유도한 SD-rat에서 8주간 투여 후 체중, 복부내 지방, 혈청지질 등을 관찰하였다. 5군의 시험물질 투여군 모두 대조군에 비하여 체중 증가율이 전반적으로 낮게 나타났다. T3군(털부처꽃:들단풍=50:50)에서 가장 낮은 체중 증가율을 보였고 복장 및 고환 지방함량도 가장 낮았음. 총콜레스테롤과 중성지방의 함량도 T3군이 가장 낮게 나타났다.

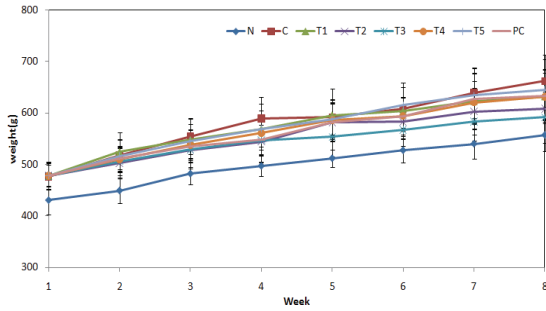


그림 11. 체중증가량

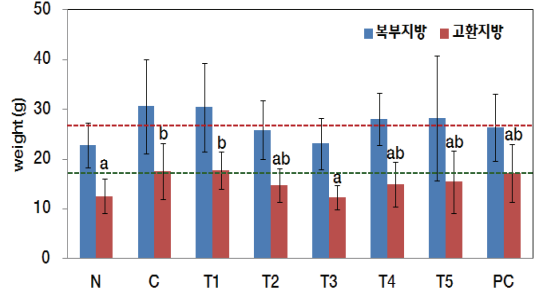


그림 12. 복부 및 고환지방

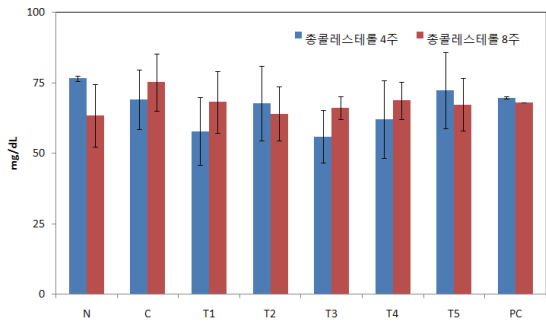


그림 13. 총콜레스테롤 함량

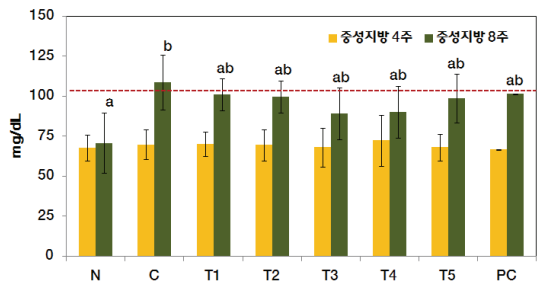


그림 14. 중성지방 함량

## 2) 털부처꽃, 돌단풍 에탄올 추출물의 조합별 비교 재현성 평가

털부처꽃, 돌단풍 2종의 조성비에 따른 항비만 효과를 검증한 결과, 털부처꽃과 돌단풍 50:50의 비율이 가장 좋은 효과를 나타내었다. 따라서 재현성평가를 위해 조합비율 중 높은 효과를 나타낸 털부처꽃과 돌단풍 70:30의 비율(T1)과 털부처꽃과 돌단풍 50:50의 비율(T2)을 대상으로 동물실험을 수행하였다. 그 결과 두 실험군은 유사한 항비만 효과를 나타내었다. 따라서 조합별 비교 시험과 재현성 시험을 종합적으로 비교하여 최종적으로 털부처꽃과 돌단풍 50:50의 비율로 결정하였다.

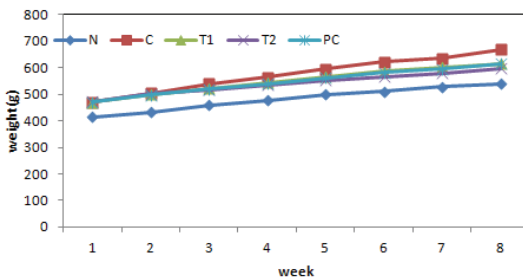


그림 15. 체중증가량

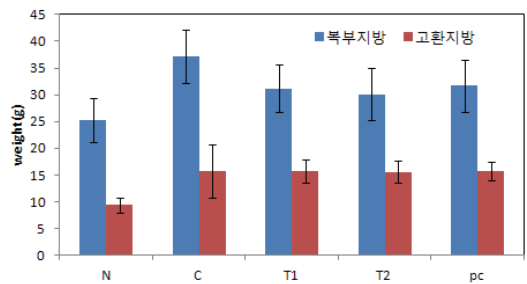


그림 16. 복부 및 고환지방

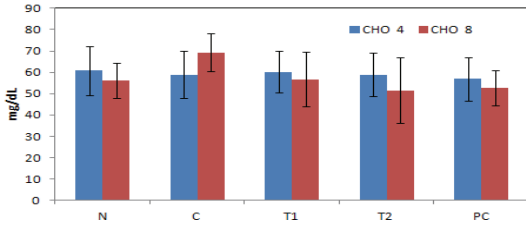


그림 17. 총콜레스테롤 함량

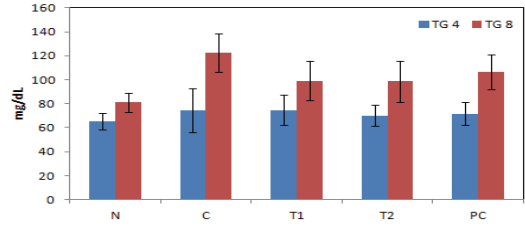


그림 18. 중성지방 함량

### 3) 마. 털부처꽃, 들단풍 에탄올 추출물 최적 조합의 용량별 효능 평가

털부처꽃, 들단풍 2종의 결정된 조성비인 50:50의 최적 조합의 용량에 따른 항비만 효과를 검증하기 위하여, 고지방식이(High Fat diet 45% 사료를 6주간 투여)로 유도한 SD-rat에서 8주간 투여 후 체중, 복부내 지방, 혈청지질 등을 관찰하였다. 털부처꽃과 들단풍 혼합물(50:50)을 용량별로 3개의 처리군으로 나누어 항비만 효과를 검증한 결과, 체중증가량 및 복부와 고환 지방량은 T2와 T3 처리군이 가장 효과가 좋았으며 2처리군이 유사한 결과를 나타내었다.

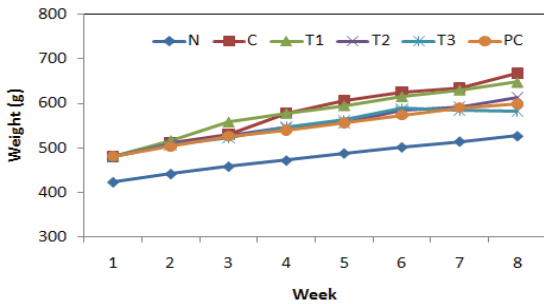


그림 19. 체중증가량

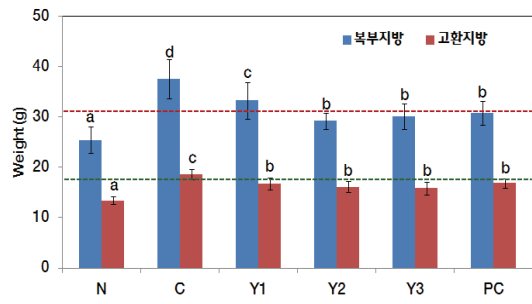


그림 20. 복부 및 고환지방

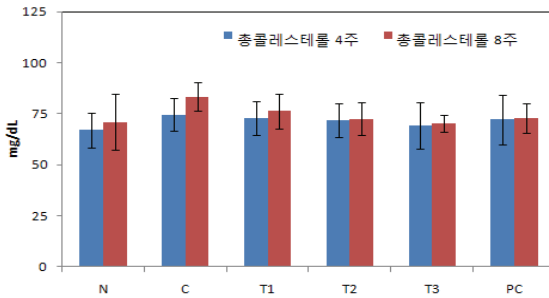


그림 21. 총콜레스테롤 함량

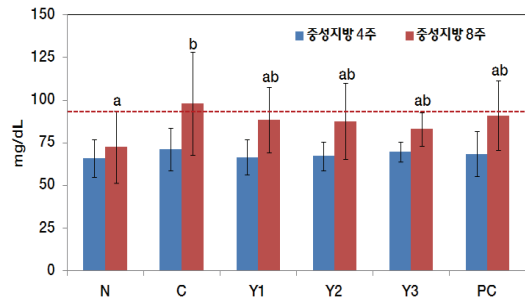


그림 22. 중성지방 함량

### 4) 털부처꽃, 들단풍 에탄올 추출물의 최적 조합의 용량별 재현성 평가

털부처꽃, 들단풍 2종의 결정된 조성비인 50:50의 최적 조합의 용량에 따른 항비만 효과를 검증한 결과, T2군이 최종 선발되었다. 재현성 평가를 수행한 결과, 비슷한 결과를 얻었으며, 최종적으로 T2군의 용량인 250mg/kg이 선정되었다.

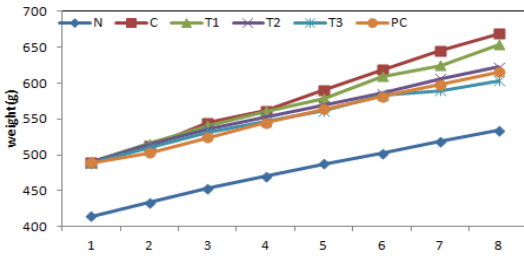


그림 23. 체중 증가량

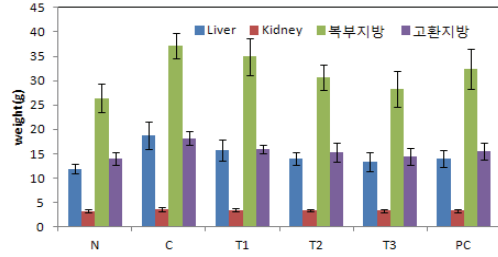


그림 24. 장기 무게

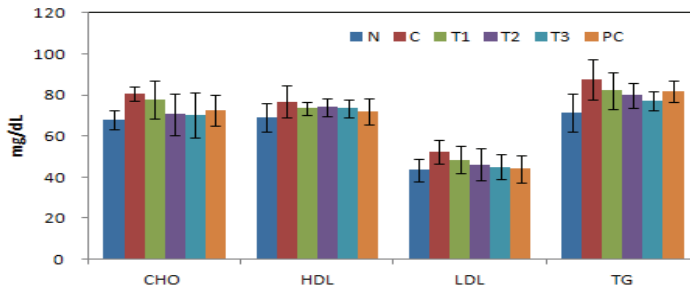


그림 25. 혈청 분석결과

#### 다. 털부처꽃과 돌단풍 잎 에탄올 추출물의 항비만 활성 탐색

털부처꽃과 돌단풍 에탄올 추출물과 혼합물(10 mg/ml 처리)의 기능성 검정(lipase 저해활성) 결과, lipase 저해활성으로는 털부처꽃과 돌단풍 혼합물의 활성은 털부처꽃 단독처리와 비슷한 활성을 나타내었다.

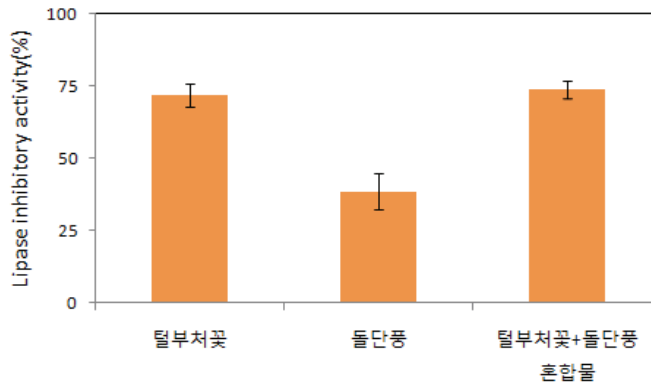


그림 26. 털부처꽃, 돌단풍 에탄올 추출물과 혼합물의 lipase 저해활성(%)

털부처꽃과 돌단풍 에탄올 추출물과 혼합물(1 mg 처리)의 기능성 검정(비만세포 분화저해 효과) 결과, 3T3-L1 분화 저해효과로 털부처꽃과 돌단풍 혼합물의 활성은 털부처꽃 단독처리와 비슷한 활성을 나타내었다.

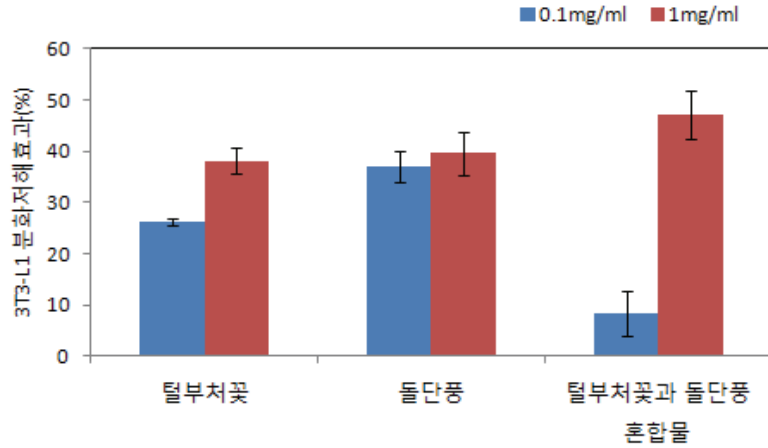


그림 27. 털부처꽃, 돌단풍 에탄올 추출물과 혼합물의 비만세포 분화억제효과(%)

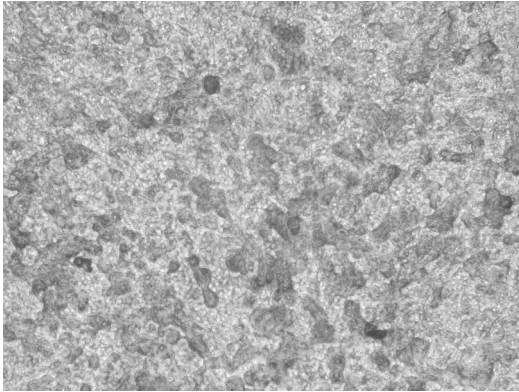


그림 28. 대조구

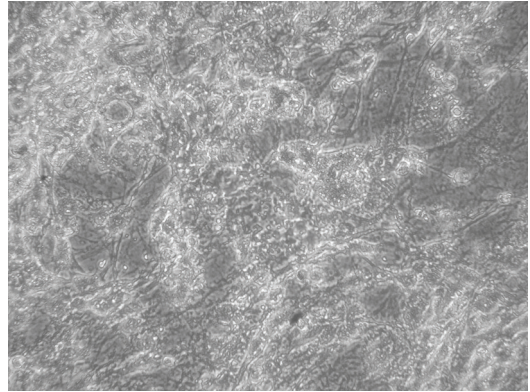


그림 29. 털부처꽃과 돌단풍(1:1) 처리(1mg처리)

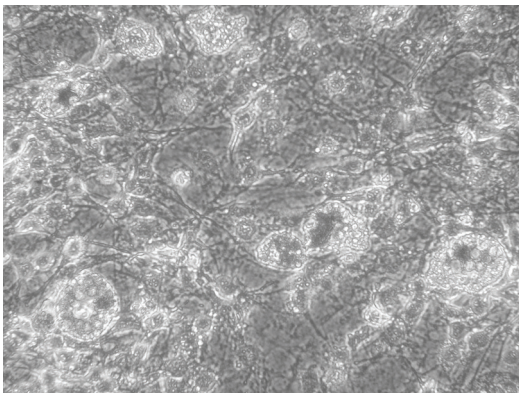


그림 30. 털부처꽃(1mg처리)

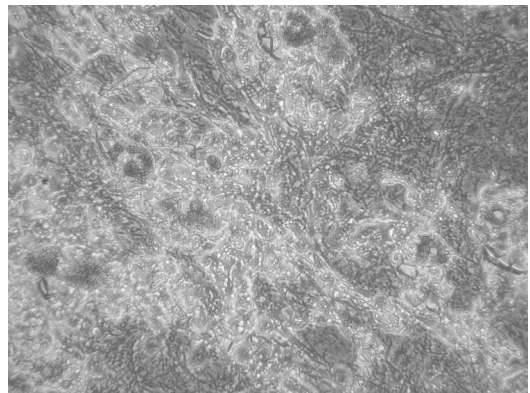


그림 31. 돌단풍(1mg처리)

## 라. 털부처꽃과 돌단풍의 지질대사

털부처꽃과 돌단풍 에탄올 추출물이 항비만과 관련된 주요 효소들인 acyl coenzyme A synthetase(ACS), lipoprotein lipase(LPL) 및 carnitine-acetyl transferase(CAT)에 미치는 영향을 알아보았다. 털부처꽃 에탄올 추출물은 10 mg/ml 처리시 206%의 높은 ACS활성과 17.1%의 CAT 활성을 나타내었다. 돌단풍 에탄올 추출물은 10 mg/ml 처리시 466%의 높은 ACS의 활성을 나타내었다.

표 10. 털부처꽃과 돌단풍 에탄올 추출물의 지질대사관련 효소 활성검정

Experimental group		Lipoprotein lipase	Acyl-CoA synthetase	Carnitine acyltransferase
Control		5.26±0.24	6.24±0.46	35.16±2.51
털부처꽃 에탄올 추출물	1 mg/ml	6.50±0.08	7.49±2.12	11.52±4.44
	10 mg/ml	5.53±0.14	12.86±2.09	41.16±0.43
돌단풍 에탄올 추출물	1 mg/ml	5.39±0.60	13.72±2.77	18.12±3.06
	10 mg/ml	7.29±0.17	29.08±6.43	13.20±3.55

## 마. 털부처꽃과 돌단풍의 지표성분 설정 및 시기별 성분과 활성 비교

- 1) 지표성분설정 : 털부처꽃의 지표성분으로 isovitexin, homoorientin 설정, 돌단풍의 지표성분으로 astragaloside, rutin 설정되었다.

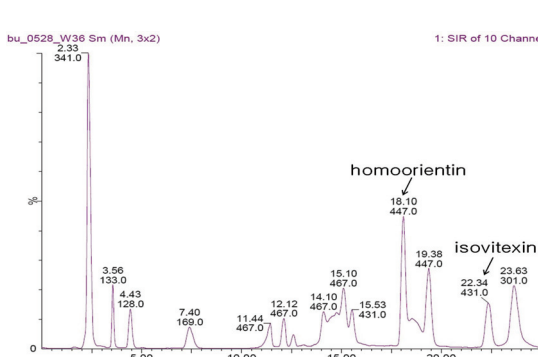


그림 32. 털부처꽃 지표성분 LC/MS 분석

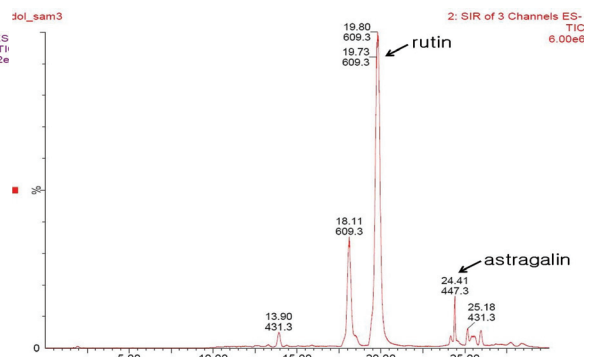


그림 33. 돌단풍 지표성분 LC/MS 분석

- 2) 시험방법 결정 : LC/MS를 이용한 털부처꽃과 돌단풍 지표성분의 시험방법을 결정하였으며, 털부처꽃과 돌단풍 혼합물의 동시분석이 가능하다.

표 11. 털부처꽃과 돌단풍 지표성분 분석 조건

Classification	Condition				
Instrument	Waters autopurification system (Waters, USA)				
	Waters 3100 single mass system (Waters, USA)				
Column	SunFire™ C <sub>18</sub> (4.6 × 150 mm, 5 μm)				
Mobile phase	Eluent A: d-water, Eluent B: Acetonitrile				
Injection volume	10 μL				
Run time	35 min				
Mode	Negative				
Capillary (V)	3.30	Source temp °C	150	Ion Energy	0.5
Extractor (V)	2	Desolvation temp °C	350	Gain	1
RF lens (V)	1	LM 1 Resolution	14	Desolvation gas flow ( L/hr )	650
Cone (V)	45	HM 1 Resolution	14		

Gradient table

Time	Flow rate	%A	%B
initial	1.0	95	5
5	1.0	95	5
7	1.0	85	15
10	1.0	82	18
12	1.0	81	19
20	1.0	81	19
21	1.0	70	30
25	1.0	70	30
27	1.0	95	5
30	1.0	95	5

3) 건강기능성 식품 원재료 등록을 위한 털부처꽃, 돌단풍의 시기별 지표성분 함량 비교 및 활성비교를 위해 월별 시료를 확보하였다. 털부처꽃과 돌단풍의 시기별 지표성분을 분석한 결과, 털부처꽃의 경우 5, 6, 7월 지표성분 함유량 모두 차이가 없었으며, 돌단풍의 경우 6월 시료에서 astragalin의 함량이 가장 높았다.

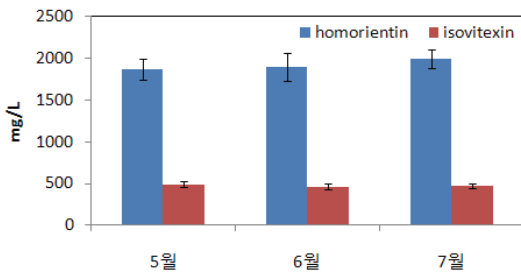


그림 34. 털부처꽃의 시기별 지표성분 함량 비교

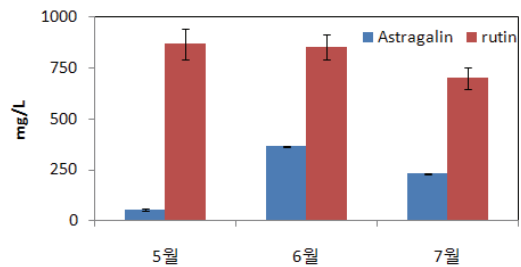


그림 35. 돌단풍의 시기별 지표성분 함량 비교

### 바. 털부처꽃으로부터 항비만 활성물질의 분리

털부처꽃 에탄올 추출물을 5개의 분획층(hexane, methylene chloride, ethyl acetate, butanol, water)으로 분리 후, lipase 저해활성을 측정해본 결과, 10 mg/ml 처리시 butanol 분획층의 저해활성이 63%로 가장 높았다.

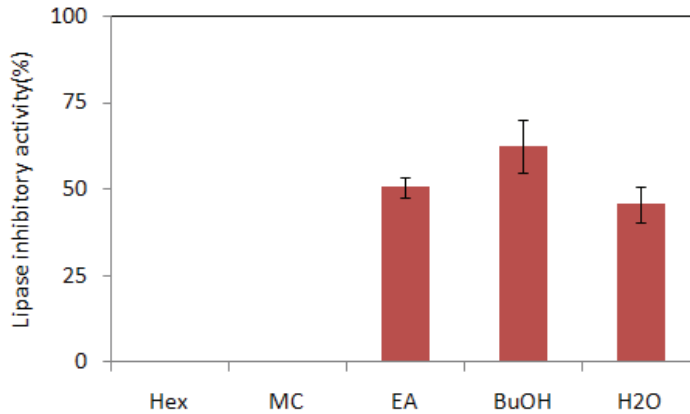


그림 36. 털부처꽃 분획층의 lipase 저해활성(%)

선발된 털부처꽃 butanol 분획층으로부터 항비만 활성물질 분리를 위하여 MPLC를 사용하여 총 4개의 분획물로 분리하였으며, 분리한 4개 분획층의 lipase 저해활성을 측정한 결과 그 중 BD 분리물(77.0%)의 활성이 가장 높았다.

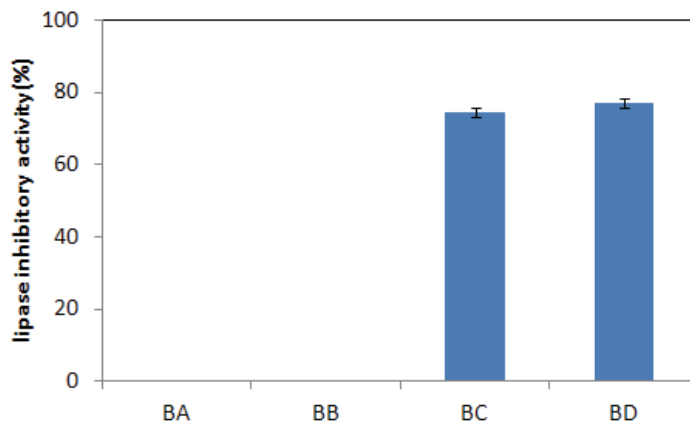


그림 37. 털부처꽃 분획물의 lipase 저해활성(%)

BD 분리물을 prep-LC/MS를 사용하여 총 3개의 분획물로 분리하여 그 활성을 검정하였고, 그 중 활성이 높게 나온 BDB와 BDC를 동정하였다. BDB는  $C_{21}H_{20}O_{11}$ 의 구조로 분자량

448.38의 orientin으로 추정되며, BDC는  $C_{21}H_{21}O_{11}$ 의 구조로 분자량 449.10인 cyanidin-3-monoglucoside로 추정된다.

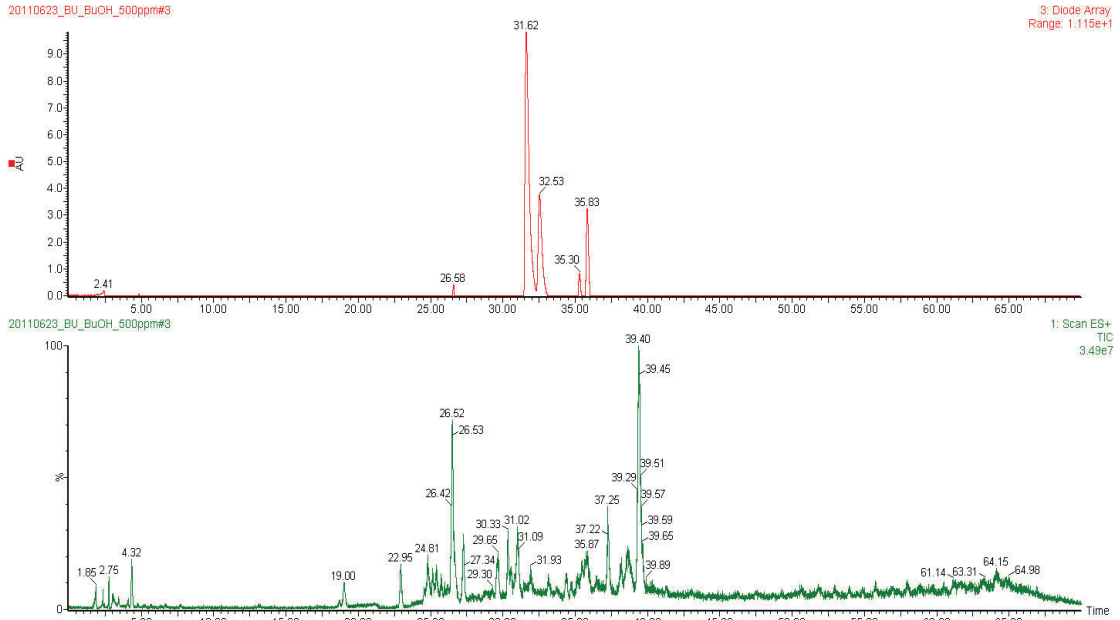


그림 38. 털부처꽃 BD 분획물의 prep/LC/MS(위:UV, 아래:MS) 스크리닝 결과

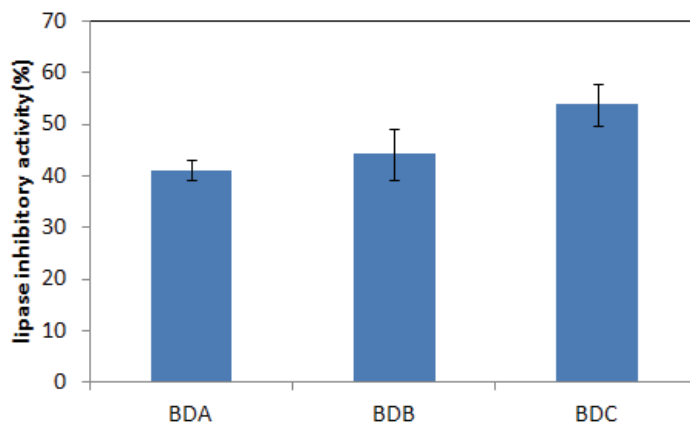


그림 39. 털부처꽃 BD 분리물의 lipase 저해활성(%)

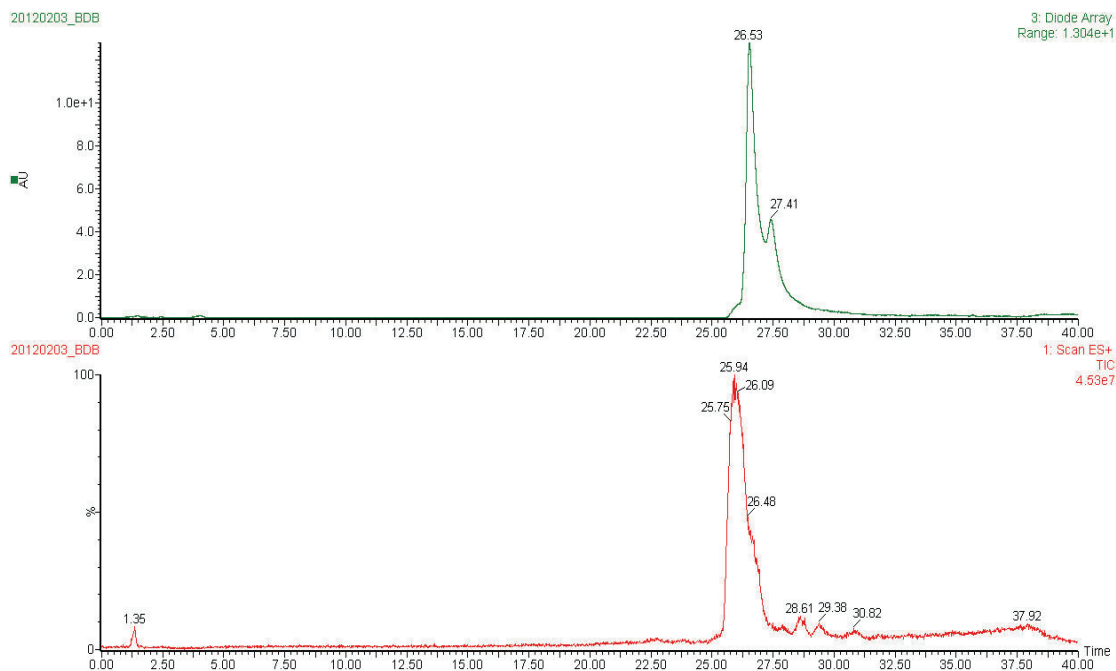


그림 40. BDB의 prep/LC/MS spectrum

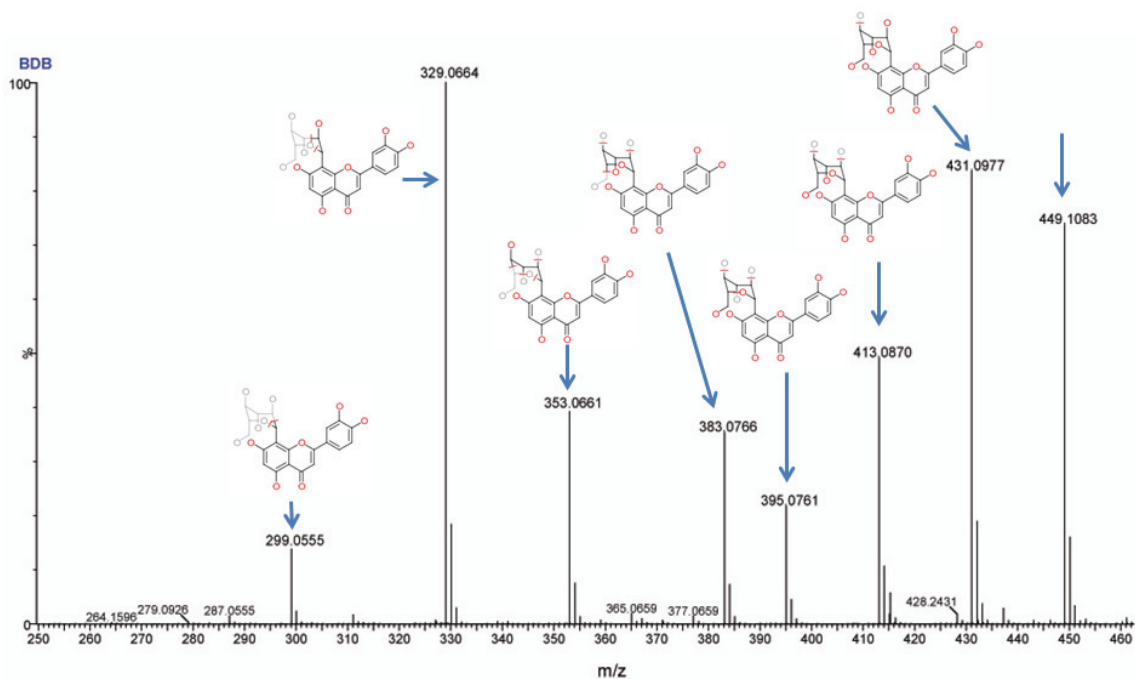


그림 41. BDB의 동정

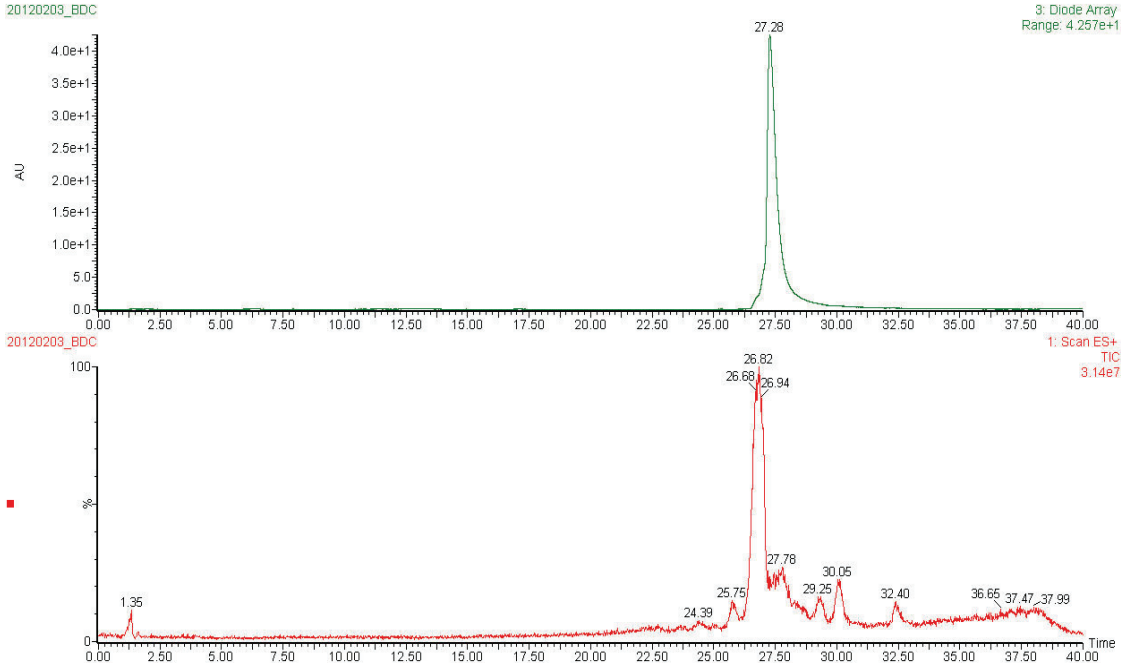


그림 42. BDC의 prep/LC/MS spectrum

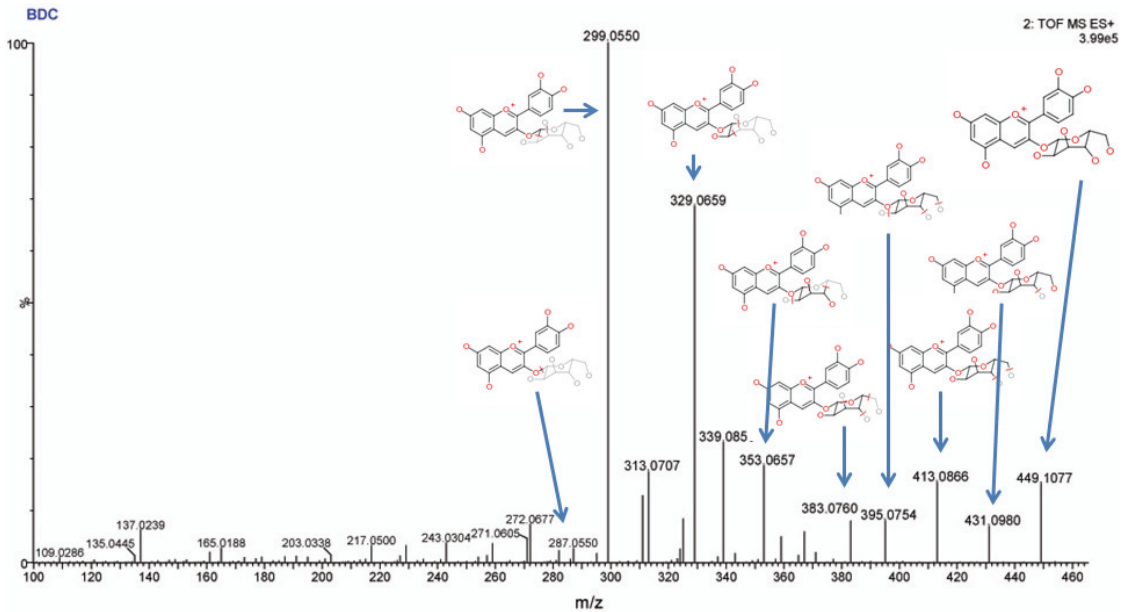


그림 43. BDC의 동정

### 사. 산채 활용도 증진을 위한 분말화 연구

참취의 분말화를 위해 참취의 블렌칭 처리별로 착즙하여 착즙액 및 추출잔사의 고형분 함량을 측정하였다(표 12). 착즙 후 시간 경과시의 색도 변화를 측정하였으며, 착즙액을 농축하고 피복물질 및 조성비율별 수용성 분말을 제조하였다. 그 결과 착즙액량이 가장 많이 나온 처리구로는 탄산수소나트륨 1% 처리였으며, 착즙후 1일 경과시의 색상(녹색)도 가장 높았다.

표 12. 블렌칭 처리에 따른 착즙액 및 추출잔사의 고형분 함량

구분	블렌칭후 (g)	착즙액			추출 잔사			총고형 분량 (g)
		액량 (ml)	고형분 (%)	고형분량 (g)	무게 (g)	고형분 (%)	고형분량 (g)	
0%	1512.3	883.1	2.6	23.0	502.6	20.7	104.0	0.1
0.05%	1394.2	852.2	3.2	27.3	497.9	20.3	101.1	0.1
0.1%	1412.9	888.9	2.7	24.0	492.0	20.5	100.8	0.1
0.5%	1446.9	928.7	2.9	26.9	497.1	21.3	105.7	0.1
1%	1495.0	949.1	2.5	23.7	494.5	19.2	94.7	0.1
2%	1402.8	890.2	2.4	21.4	485.1	17.3	83.9	0.1

\*블렌칭 : 참취 생체 1kg, 탄산수소나트륨 0~2% 1분 처리

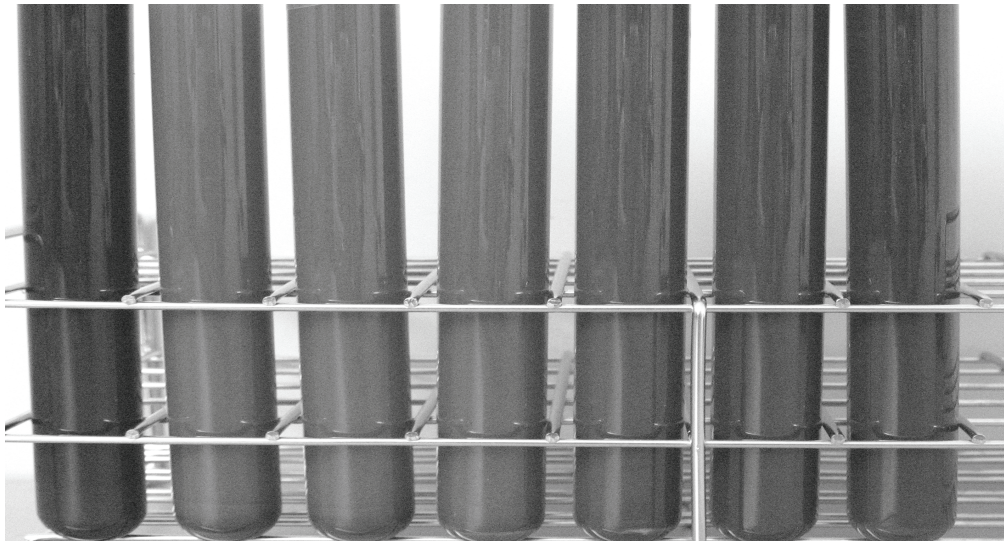


그림 44. 착즙후 상온 1일 경과후의 색상 변화  
(좌로부터 생체, 탄산수소나트륨 0%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2% 처리)

표 13. 블랜칭 및 착즙후 시간의 경과에 따른 색도의 변화

탄산수소나트륨 처리 농도	식물체			착즙액					
				착즙직후			24h 경과후		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b
생체	36.1	-9.0	17.6	26.9	-0.8	2.3	29.1	-1.7	5.8
0%	29.7	-10.6	15.1	33.4	-8.9	12.7	35.2	-1.2	13.0
0.05%	31.7	-11.3	17.3	32.8	-8.6	11.9	34.7	-1.6	11.9
0.1%	27.3	-9.3	12.5	32.5	-8.3	11.3	34.4	-2.2	10.8
0.5%	28.9	-9.6	13.9	30.1	-6.2	7.7	31.9	-3.7	7.7
1%	26.3	-8.1	9.9	28.7	-4.9	5.5	29.4	-3.9	4.2
2%	26.1	-9.0	11.8	27.5	-4.1	4.0	27.8	-3.4	2.3

표 14. 착즙액과 농축액의 특성 비교

	Bx	고형분	색도		
			L	a	b
착즙액	2.1	2.4	25.41	-5.11	5.28
농축액	22.4	23.5	27.05	-2.88	3.35

\* 농축액의 점도 : 0.5d·Pas



그림 45. 참취 농축액



그림 46. 참취 수용성 분말  
(좌: dextrin(1), 우: arabic gum:dextrin(3:1))

#### 아. 산채 잔사 활용 쿠키 제조

털부처꽃과 돌단풍 추출후 잔사(1:1 혼합)와 털부처꽃과 돌단풍의 건체(1:1 혼합)의 재료 특성을 파악하기 위하여 일반 쿠키제조법에 잔사와 건체 혼합물을 2, 5, 10%씩 첨가하여 쿠키를 제조하였다. 식미검사결과 추출 잔사 및 건체의 첨가량 5%에서 좋은 결과를 나타냄.

일반성분 분석결과, 잔사 및 건체 5%의 조섬유 함량이 2, 1.1 g/100g으로 향후 칼로리가 낮은 증량제 및 오일 첨가로 인한 다이어트 쿠키 제조가 가능할 것으로 예상되었다.

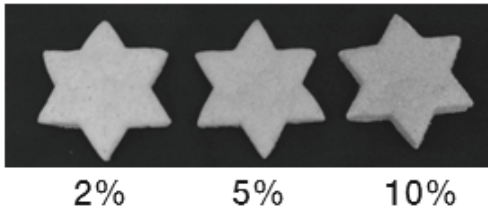


그림 47. 추출물 잔사활용 쿠키제조

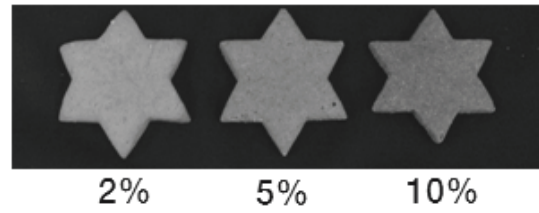


그림 48. 건체 활용 쿠키 제조

표 15. 잔사 및 건체활용 쿠키의 일반성분 분석

시료 상태	첨가량	100 g 당						
		에너지 (kcal)	수분 (g)	조단백 (g)	조지방 (g)	조회분 (g)	탄수화물 (g)	조섬유 (g)
추출잔사	2%	369	13.19	3.8	14.8	0.7	67.5	1.2
	5%	369	13.75	3.3	15.3	0.9	66.8	2.0
	10%	369	13.63	3.4	15.6	1.4	65.9	3.5
건체	2%	374	12.01	3.3	15.1	0.8	68.8	1.0
	5%	365	14.08	3.6	14.8	1.0	66.6	1.1
	10%	353	16.55	3.5	14.6	1.6	63.7	2.2

#### 4. 적 요

강원도 자생산채 90종을 수집, 추출하여 항비만 활성 검정인 효소, 세포, 동물실험을 통해 최종적으로 털부처꽃과 돌단풍을 선발하였다. 동물실험을 통해 선발 산채 최적 혼합비율인 털부처꽃과 돌단풍(50:50) 및 용량(250mg/kg)을 결정하였고, 임상시험을 위한 자료로 활용하였다. 임상시험을 위해 털부처꽃과 돌단풍을 증식하여 추출물을 공급하였으며, 털부처꽃의 지표성분으로 isovitexin, homoorientin, 돌단풍의 지표성분인 astragaloside, rutin을 각각 설정하여 시기별로 성분 분석을 하였다. 털부처꽃과 돌단풍의 지질대사에 관여하는 효소 검정 및 항비만 활성을 검정하였으며, 털부처꽃으로부터 항비만 활성물질인 orientin과 cyanidin-3-mono glucoside로 추정되는 물질을 분리하였다.

#### 5. 인용문헌

Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl M. 1974. Enzymes as biochemical reagents. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU, ed. Academic Press, New York, NY, USA. Vol I, p 438-444.

Fuwa H. 1954. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as substrate. *J Biochem* 41: 583-603.

Houghton PJ, Soumyanath A. 2006.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J Ethnopharmacol* 107: 449-455.

Kim YJ, Kim BH, Lee SY, Kim MS, Park CS, Rhee MS, Lee KH, Kim DS. 2006. Screening of medicinal plants for development of functional food ingredients with anti- obesity. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 221-226.

Oh HT, Chung MJ, Kim SH, Choi HJ, Ham SS. 2009. Masousalmon (*Oncorhynchus masou*) ethanol extract decrease 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase expression in diet-induced obese mice. *Nutr Res* 29: 123-129.

Quinn DM, Shirai K, Jackson RL, Harmony JK. 1982. Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II. *Biochemistry* 21: 6872-6879.

Reeves PG, Nielson FH, Fahey Jr GC. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.

Shimizu S, Inoue K, Tani Y, Yamada H. 1979. Enzymatic microdetermination of serum free fatty acids. *Anal Biochem* 98: 341-345.

Wang HZ, Chang CH, Lin CP, Tsai MC. 2006. Using MTT viability assay to test the cytotoxicity of antibiotics and steroid to cultured porcine corneal endothelial cells. *J Ocular Pharm Therapeutics* 12: 35-43.

## 6. 연구결과 활용

연도 (연차)	활용구분	제 목
2009(1년차)	학술발표 (국내)	강원 자생 산채로부터 항비만 활성 탐색
	영농 활용	털부처꽃 식품원료 사용 가능 등재 요청
	제도개선	털부처꽃 식품원료 사용가능 등재 요청
	이화학분석	산채류의 항비만 활성 검증

연도 (연차)	활용구분	제 목	
2010(2년차)	논문게재 (비SCI)	털부처꽃 잎 추출물의 생리활성 탐색	
		돌단풍 잎 용매추출물의 생리활성	
		비타민나무( <i>Hippophae rhamnoides</i> L.) 줄기로부터 항염 활성물질 $\beta$ -Sitosterol의 분리	
		비타민나무( <i>Seabuckthorn, Hippophae rhamnoides</i> L.) 부위별 추출물의 생리활성 비교	
	산업재산권 출원	털부처꽃 잎 에탄올 추출물을 포함하는 당뇨, 비만의 예방 및 치료용 조성물	
		돌단풍 잎 에탄올 추출물의 제조방법 및 동 방법에 의해 제조한 돌단풍 잎 에탄올 추출물을 포함하는 당뇨, 비만의 예방 및 치료용 조성물	
	학술발표 (국내)	강원 자생 산채로부터 항비만 활성 탐색	
		Biological Activities in the extract of <i>Lythrum salicaria</i> L.	
		Anti-obesity Effect of ethanol extracts from <i>Lythrum salicaria</i> L.	
			돌단풍 잎 추출물의 생리활성탐색
	2011(3년차)	논문게재 (비SCI)	강원도 자생 산채 추출물의 $\alpha$ -amylase, $\alpha$ -glucosidase, lipase 효소 저해활성 탐색
			털부처꽃 에탄올 추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향
돌단풍 에탄올 추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향			
산업재산권 출원		털부처꽃과 돌단풍 잎 에탄올 추출물 혼합물을 포함하는 비만의 예방 및 치료용 조성물	
학술발표 (국내)		털부처꽃으로부터 항비만 활성물질의 분리	
영농활용		항비만 활성이 뛰어난 털부처꽃과 돌단풍 혼합제 선발	
기술이전		털부처꽃 잎 에탄올 추출물을 포함하는 당뇨, 비만의 예방 및 치료용 조성물	
홍보		국내 자생산채의 비만예방효과	

## 7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도		
					'09	'10	'11
책임자	강원도원 농산물이용시험장	농업 연구관	김경희	세부과제 총괄	○	○	○
공동 연구자	"	농업 연구사	김희연	과제 수행, 물질 분리·분석	○	○	○
"	"	"	최병곤	산채 가공상품 개발	○	○	○
"	"	"	이광재	기능성 검정	○	○	○
"	"	"	정햇님	식물 수집 및 표본제작	○		
연구 보조원	"	전기직	윤갑수	식물 수집 및 연구지원	○	○	○
"	"	기능직	최병철	산채 증식 및 포장관리	○	○	○
"	"	"	신재일	식물 수집 및 운반	○	○	○
"	"	연구원	박유화	기능성 검정	○	○	○
"	"	"	함헌주	물질 분리	○	○	○
"	"	"	이기연	물질 분리	○	○	○
"	"	"	권창주	동물 실험	○	○	○
"	"	"	홍수영	물질 분석	○	○	○
"	"	"	정경화	추출물 조제	○		
"	"	"	주명희	시료 전처리			○
"	"	"	김연화	추출물 조제			○