



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2016년 8월

박사학위논문

두충나무 수액 및 진액의 항세균 및 항산화 활성 연구

조선대학교 대학원

보완대체의학과

신 지 훈

두충나무 수액 및 진액의 항세균 및 항산화 활성 연구

Antibacterial and Antioxidant Activities of *Eucommia*
Ulmoides Oliver (Duzhong) Saps

2016년 8월 25일

조선대학교 대학원
보완대체의학과
신 지 훈

두충나무 수액 및 진액의 항세균 및 항산화 활성 연구

지도교수 유 진 철

이 논문을 보완대체의학박사학위
신청논문으로 제출함

2016년 4월

조선대학교 대학원
보완대체의학과
신 지 훈

신지훈의 박사학위논문을 인준함

위 원 장 조선대학교 교 수 이 미 자 인

위 원 조선대학교 교 수 소 금 영 인

위 원 광주대학교 교 수 이 효 정 인

위 원 목포대학교 교 수 조 승 식 인

위 원 조선대학교 교 수 유 진 철 인

2016년 6 월

조선대학교 대학원

목차

도 목차	iv
표 목차	v
ABSTRACT	vi
List of Abbreviations	x
I. 서론	1
1. 자연의학의 정의	1
2. 두충의 일반적인 특징	1
3. 두충의 성분 및 민간에서의 활용	8
가. 두충의 성분	8
나. 한방에서의 이용	11
4. 연구의 필요성 및 목적	12
II. 재료 및 방법	15
1. 두충 수액 및 진액의 유기용매 분획물 제조	15
가. 두충 수액 채취 및 진액의 준비	15
나. 두충 수액 및 진액의 ETAC 분획	20
2. 시약	21
3. 항산화 효능 평가	22

가. DPPH 라디칼 소거능 측정	22
나. 환원력 평가	22
다. 총페놀 함량 측정	22
4. 세포 배양 및 독성 평가	23
가. 세포 배양	23
나. 세포 독성 평가	23
다. 일산화질소 생성량 측정	23
5. 두충 수액 및 진액의 ETAC 분획물의 세균 활성화	24
가. 항세균 활성화	24
6. 두충 수액 ETAC 분획물의 항세균 활성화 분석	24
III. 결과	26
1. 항산화 효능 평가	26
가. DPPH radical 소거능	26
나. 환원력 평가	28
다. 총페놀 함량 측정	30
2. 세포 독성 및 일산화질소 억제능 평가	32
3. 두충나무 추출물의 항균 스펙트럼 비교	34
가. 항세균 활성화	34
4. 두충 수액 ETAC 분획물의 항세균 활성화 분석 결과	36

IV. 고찰	42
V. 결론	45
VI. 참고문헌	47
VII. 감사의 글	53

도 목차

Fig. 1. The crusted cortex and cross-section of Eucommia	3
Fig. 2. Eucommia under the microscope	4
Fig. 3. The gutta percha stringy	6
Fig. 4. Currently used in the oriental medicine	7
Fig. 5. The Chemical Structure of main ingredient	10
Fig. 6. Blackened by the saps	14
Fig. 7. peeling off the layers	16
Fig. 8. Sap extract	17
Fig. 9. Liquamen extract	19
Fig. 10. DPPH radical scavenging activity	27
Fig. 11. Reducing power measurement	29
Fig. 12. The measuring of the total phenolic content	31
Fig. 13. The Effect on the cell viability	33
Fig. 14. Elemental analysis of the saps	37

표 목차

Table 1. GC / MS analysis conditions apparatus	25
Table 2. Antibacterial Spectrum	35
Table 3. GC / MS analysis	39
Table 4. The comparing the effects of bark, leves and saps	40

ABSTRACT

Antibacterial and Antioxidant Activities of *Eucommia* *Ulmoides Oliver*(Duzhong) Saps

Ji-Hoon, Shin

Advisor : Prof. Yoo, Jin Cheol, Ph.D.

Department of Complementary and Alternative
Medicine,

Graduate School of Chosun University

Background & purpose

Eucommia ulmoides is a Traditional Chinese Medicine that has been used for longevity, being strengthen the muscles and joints. While traditional application of *Eucommia* was more focused with its effects on muscles and bones, recent scientific evidence supports the immune, anti-cancer, and anti-hypertensive properties of *Eucommia* barks and leaves. In practice, it has been shown that various compounds identified from *Eucommia* such as flavonoids, lignans, and iridoids, exhibit the above medical properties. Furthermore, a new component called “Eucommicin A” was also shown to suppress cancer stem cells.

So far numerous studies have been conducted on the protective effects on hypertension, obesity, osteoporosis, safety assistants of corticosteroids of *Eucommia* bark and leaves. It was very effective in animal, but did not in humans, except for the blood pressure reduction. In this paper, we changed the experimental method and chose its sap

and its liquamen that were not previously studied to further examine the health benefits of Eucommia.

Methods

After peeling its bark, we collected the 150 ml of sap, centrifuged it, extracted with Ethyl Acetate, and then again concentrated by vacuum concentrator. The liquamen were obtained by the following method. Without adding any water, to the tree trunk Eucommia 10 kg by heating at a temperature of 105°C for 24 hours, we got the 2.5 L and then in the same as above. If the gutta percha of its bark were to protect the plants from insects and fungus, there is more expectation in the inner trunk, its saps.

We measured the following from the collected sap and the liquamen,

1) the DPPH radical scavenging ability and 2) reducing power 3) total phenol content, 4) the cytotoxicity and the nitric oxide production, 5) the antibacterial activity through the antimicrobial spectrum, and 6) the component analysis.

Result

Each result is as follows.

1. As to the radical scavenging ability, in the high concentration (0.05 ~ 1 mg/ml) showed the effect of 30~80% in comparison to the ascorbic Acid. But it was nearly the same as those in the low concentration

cases. It is similar to the radical scavenging ability of α -tocopherol.

2. The high concentration of the sap showed 50% performance as to the reducing power in comparison with the ascorbic Acid. It was nearly the same in the low concentration. However, very excellent reducing power was being shown in the case of the liquamen. It is nearly similar the level like the ascorbic Acid in the high concentration(0.5 mg/ml or more), but in the low concentration less than 0.1, the reducing power was shown more than two times.

3. The total phenol content was not so higher than the gallic Acid, which is the control group. The total phenol content in the liquamen showed a little bit more because of heating for a long time. However, it is regarded that compound having the phenol.

4. As to the cytotoxicity test, the survival rate in the sap was high concentration. However, the cell which becomes extinct was abundant in the liquamen of the high concentration(0.05 mg/ml or more). It means that the side effect will be able to follow in case of taking this in the high-capacity.

5. As the antibacterial spectrum analysis, They are no reaction in the Gram- negative bacteria - *Alcaligenes faecalis* ATCC 1004, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Escherichia coli* KCTC 1923, ESBL P3, ESBL U4, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637. But the inhibition zone of the liquamen are wider than the sap in the Gram-positive bacteria - KCTC 1928, MRSA 4-5, MRSA 693E, the VRSA

6. The ingredient of the sap is similar to the vegetable Sterol line. β -sitosterol and Stigmasterol are mainly contained and there seems to be some influence on the decrease of serum cholesterol and anti-cancer, antibiotic, and AD. The ingredient of the sap is similar to the vegetable Sterol line.

Conclusion

When comparing the sap and the liquamen, it came out of the reducing power and antibacterial activity against super bacteria. But the cytotoxin problem remained, the supplementary research should be guaranteed afterward.

The sap and the liquamen were not used in Chinese medicine so far at all, but this study confirms what the sap and the liquamen extract shows the effect like the above. It was clarified they have the effects as much as the bark and leaves through this experiment, and it must be regulated a reckless abuse of the liquamen.

Keywords : Eucommia Ulmoides Saps, Eucommia Ulmoides liquamen, Antioxidant activities, Antibacterial activities.

List of Abbreviations

E.U.S.	Eucommia Ulmoides Saps
E.U.L.	Eucommia Ulmoides Liguamen
ETAC	Ethyl Acetate
DPPH	2,2-Diphenyl picryl hydrazyl
LPS	Lipopolysaccharide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
GC/MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometer
AD	Alzheimer's Disease
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vancomycin Resistant <i>Enterococcus faecium</i>
VRSA	Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
ESBL	Extended spectrum beta lactamase <i>Escherichia coli</i>
IMP	Imipenem resistant <i>Pseudomonase aureus</i>

I. 서론

1. 자연의학의 정의

중국 후한시대의 張機가 『傷寒論』을 집필하면서 그 서문에, “우리 친족이 예전에는 200 여명이 넘었으나, 196년에서 불과 10년도 지나지 않았는데 그 동안 일족의 3/4가 죽게 되었고, 그중 70%는 유행성 독감(혹은 열병)에 의한 것이었다. 그 일이 있기 이전부터 갑작스럽게 죽거나, 혹은 어린 나이에 죽는데도 구제할 수 없는 현실이 괴로워서 고서들을 다 찾고, 여러 처방들을 널리 구하여 이 상한잡병론 16권을 지었으니, 비록 모든 병을 다 낫게 할 수는 없지만, 병을 보면 그 근원을 알 수 있고, 만약 내가 모은 책을 연구한다면 이치를 깨닫게 될 것이다[1].”라 하였다. 그리고 그가 연구한 치료법은 지금도 쓰이고 있으며, 많은 의술가들에 의해 더욱 많은 발전을 거듭하게 되었다. 이 서문이 자연의학의 효시라고는 볼 수 없지만 질병과 죽음에의 순응이 아니라 약초를 통해 이겨낼 수 있고, 단순한 이론이 아니라 경험과 연구를 통해 더욱 발전해 나아가야 하는 그의 취지로 자연의학을 설명할 수 있다.

질병에 걸리면 죽음을 기다리는 게 당연한 때를 지나, 천연물로 사람들의 질병을 치료하면서부터 자연의학(Natural medicine)은 시작되었다. 원시 미개한 사회로부터 먹을 음식과 독초와 약초에 대한 경험이 축적되고 보존법과 가공법이 진보되면서 자연스럽게 시작한 것이 자연의학이기도 하지만, 동양에서는 이를 집대성하고 문서로 작성하며 끊임없이 더 나은 치료법을 강구해 지금까지 이어져 왔다.

2. 두충의 일반적인 특징

본 연구에서 주목하는 두충은 한방에서 가장 많이 사용되는 50대 약초 중

하나인데, 보통 항간에서는 염초(鹽炒)한 두충의 껍질을 사용한다. 두충 (*Eucommia ulmoides* Oliver)은 세계적으로 유일한 1과 1속 1종의 식물이다.

두충은 양지바른 곳에서 잘 자라며, 자웅이체로 되어 있다. 낙엽활엽교목으로 10~15m까지 자라고, 수령이 오래될수록 나무의 둘레가 점차 굵어진다. 갈색을 띄는 회백색 수피를 가지고 있으며, 활엽수의 가지가 많이 분화되어 5~16cm 길이 타원 모양으로 1cm 길이의 잔털이 달린 잎자루에 달린다. 4월 무렵 꽃잎 없이 잎겨드랑이에서 단성화로 핀다. 암꽃은 꽃자루가 1개씩 짧게 붙고, 수꽃은 6~10 개 정도의 짧은 수술이 있다. 열매는 10~11월에 3cm의 장타원모양으로 시과가 달린다. 수피와 잎과 가지는 약재와 음료로 사용하고 있다. 두충의 성상은 다음과 같다.(Fig. 1.)

먼저 두충의 겉모습을 보면, 두충의 가장 바깥쪽에는 두꺼운 낙피층(落皮層)이 있고, 그 안쪽으로 두꺼운 세포벽으로 목화되어 있는 코르크세포가 여러 층으로 배열되어 있다.



Fig. 1. The crusted cortex and cross-section of *Eucommia*

(a) The crusted cortex (b) cross-section of *Eucommia*(distinguishable)

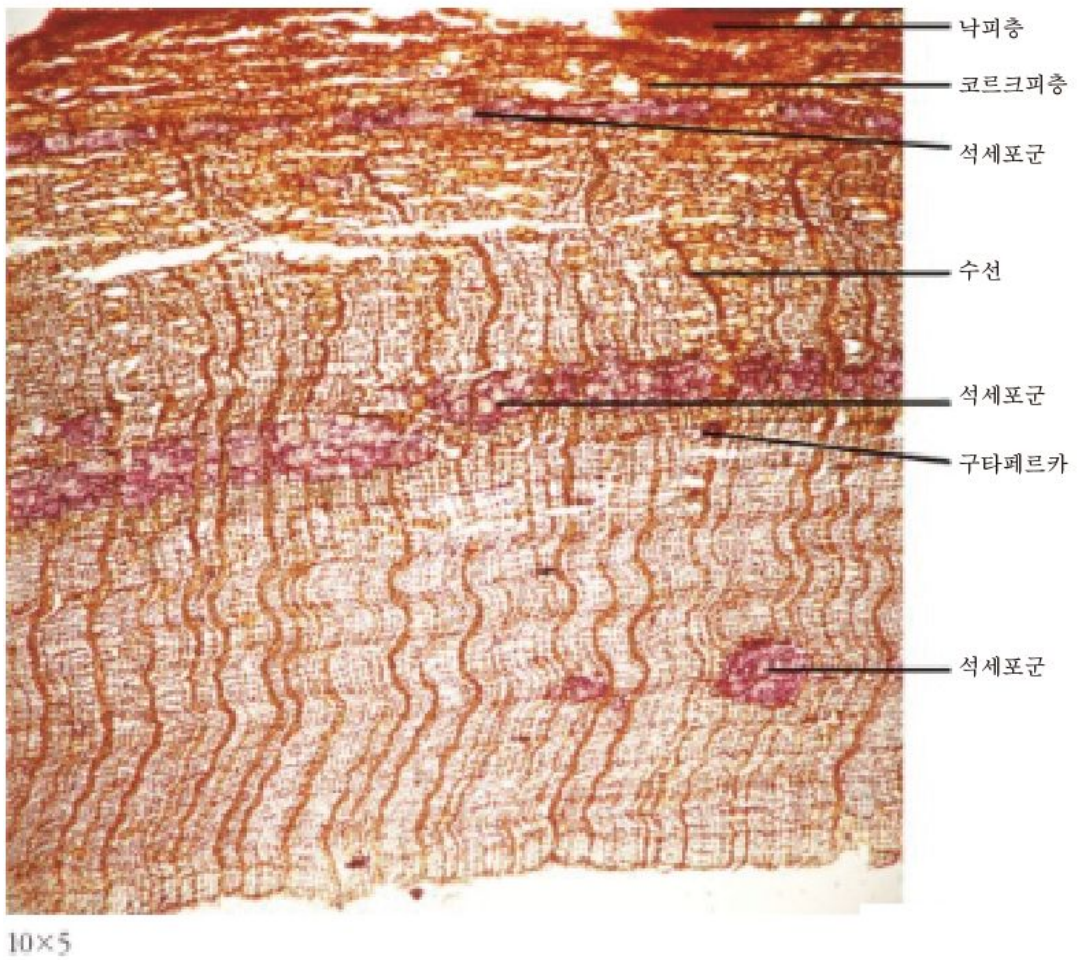


Fig. 2. Eucommia under the microscope[2]

약재로 사용하기 위해 채취하는 6~8월에는 이 사관부를 통해 수액과 체액의 이동이 더욱 활발하게 되어 나무의 중심부와 겉껍질의 사이에 수액이 넘쳐나 껍질을 벗기기 용이해진다.

코르크층의 중간에는 두껍게 목화된 석세포 고리띠가 배열되어 있다. 이러한 피부세포는 모양이 불규칙적이며, 안에는 색소가 들어 있다. 석세포 고리띠를 지나면 드문드문 gutta percha가 나온다. 이러한 구타페르카는 벗겨내었을 때, Fig. 3.에 나오는 사진처럼 은백색 사(絲)처럼 나오게 되며, 이것은 나무의 수간부를 곤충의 습격으로부터 보호하기 위해 나오는 물질로 알려져 있다.



Fig. 3. The gutta percha, stringy



Fig. 4. Currently used in the oriental medicine

- (a) used in the high heat roasting, after peeling off
- (b) gutta percha easily cut off

3. 두충의 성분 및 민간에서의 활용

가. 두충의 성분

에탄올로 추출한 껍질의 성분은 다음과 같다.

혈청 중의 s-빌리루빈과 GOP, GPT를 낮추는 Geniposidic acid (0.925% of bark)와 aglycone geniposide (0.488%), 그리고 항염증과 항암효과를 가진 genipin (0.214%)이 들어 있고[3], 항암과 갱년기 질환에 유용한 Lignans (+)-pinoresinol-4,4'-di-O-β-D-glucopyranoside (pinoresinol diglucoside[4]), (+)-pinoresinol-4-O-β-D-glucopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranoside, (+)-medioresinol-4,4'-di-O-β-D-glucopyranoside, (+)-syringaresinol-4,4'-di-O-β-D-glucopyranoside, (-)-olivil-4'-O-β-D-glucopyranoside, (-)-olivil-4-O-β-D-glucopyranoside, 정량화된 syringaresinol diglycoside (0.214%) 와 (+)-pinoresinol-di-β-d-glucopyranoside (0.991%) (+)-pinoresinol-4-O-β-D-glucopyranoside[5] 와, Licoagroside F (28.78±/0.81 μg/g)[6]와 flavonoids로서, 항암, 항염, 항균 작용을 하는 Baicalein (0.28±0.010 μg/g), 신경보호 작용을 하는 wogonin (0.20±0.0027 μg/g)과, oroxylin A (0.09±0.0040 μg/g), 항진균의 Caprylic acid와 함께 면역과 항암에 작용하는 Triterpenoids[7], 그리고 활성 산소와 과산화지질 생성을 억제하는 효과가 있는 Chlorogenic acid (0.302%)[3]이 들어 있는 것으로 밝혀졌다.

한편 두충의 잎에는,

irioid glycosides인 Geniposidic acid (10.1-17.4 mg/g)[8][9]와, 최근에 Prion Protein 5' UTR mRNA에 대한 억제제[10]로 연구되어지고 있으며, 쥐에게 복강내 80 mg/kg으로 주입했을 때, carbon tetrachloride 이나 alpha-amanitin에 의해 유발된 간 손상을 예방하는 것으로 알려진[11] Aucubin (6.5-19.7 mg/g; geniposidic acid without the carboxylic acid

group)[9][12]과, 항비만 작용의 Asperuloside (13.7–27.8 mg/g)[13][9], isoquercetin으로서 항산화 효과의 Quercetin (0.27–0.62 mg/g), rutin (7.6–14.3 mg/g), 그리고 이당류인 3-O-sambubioside[8][9], Licoagroside F at $8.97 \pm 0.41 \mu\text{g/g}$ [6]가 들어있고, Baicalein ($0.23 \pm 0.002 \mu\text{g/g}$), Wogonin ($0.19 \pm 0.0030 \mu\text{g/g}$), Oroxylin A ($0.04 \pm 0.0004 \mu\text{g/g}$), Lignans Syringaresinol di-O-Glc ($275.53 \pm 0.99 \mu\text{g/g}$)과 혈압 강하 작용을 하는 phenol성 화합물 Pinoresinol di-O-Glc ($384.15 \pm 19.67 \mu\text{g/g}$)[6][15], Chlorogenic Acid (26.3–46.9 mg/g)[8][9][16]와 항산화, 혈압강하 등의 작용을 하는 Ferulic acid와 잘 알려진 caffeic acid[8]가 들어 있다. 주요 성분들의 화학구조는 다음과 같다.

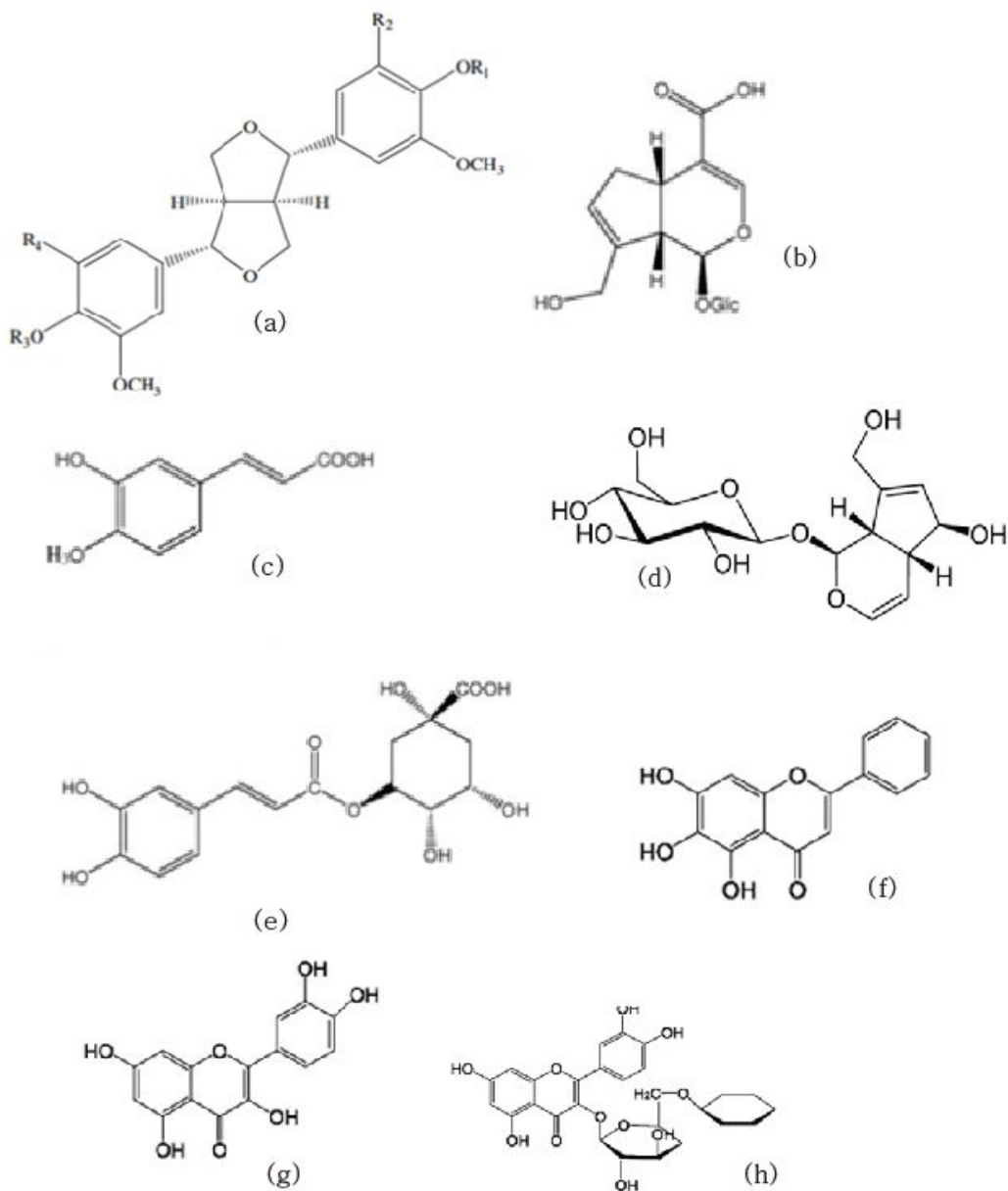


Fig. 5. The Chemical Structure of main ingredient

- (a) Lignan (b) Geniposidic Acid (c) Ferulic Acid (d) Aucubin
 (e) Chlorogenic Acid (f) Baicalein (g) Quercetin (h) rutin

나. 한방에서의 이용

현재까지 한방에서 사용하는 방법은 6~8월 사이에 껍질을 벗겨 사용하는데, 고무질의 천연수지 성분인 구타페르카가 약리 활성 작용을 방해하고, 체내에서는 위벽 보호 기능을 하기도 하지만 소화력이 약하면 고체화되어 소화장애 요소가 되어 소화불량 등의 증상이 일어나므로 가장 바깥 껍질을 거피각(去皮殼)하고, 2% 소금에 강하게 볶는 염초(鹽炒)의 방법을 사용한다. 또한 우유나 양유에 굽기도 하고, 술이나 꿀, 생강즙에 볶아 사용하기도 한다.

전통적으로 사용하는 두충은 『本草綱目』에 허리와 무릎 통증, 장의 기능을 높여 정기를 더하여 주고, 근육과 뼈를 강하게 만들어 주며, 전립선이나 요실금 등의 증상을 치료한다. 그리고 오래 먹으면 몸을 가볍게 하고, 노화를 예방한다[17]고 되어 있으며, 『東醫寶鑑』에서는 治腎冷 又治腎勞 腰脚冷痛. 或煮服 丸服 炒用[18]라고 하여, 허리가 아프거나 다리의 통증에 두충을 끓여 먹거나 환으로 만들거나 볶아서 사용하라고 되어 있다. 또한 『方藥合編』에서는 辛甘固精能小便淋瀝腰膝痛(맛은 맵고, 달다. 정기를 보존하고, 임질이나 전립선, 허리와 무릎이 시리고 아픈 통증을 치료한다.)[19]라 하였다. 한방에서는 대체로 補陽藥으로 사용되어 왔다.

두충의 껍질에 들어있는 구타페르카의 성상이 마치 인간의 힘줄이나 인대 등의 구조와 유사해 보이기 때문에, 주로 관절염 치료제로 사용되어 왔을 것이며, 함께 사용하는 우슬(*Achyranthes japonica Nakai*)의 모양도 소의 관절과 유사한 모습이기 때문에 관절염 치료에 좋을 것이라는 막연한 상형학적 사유(思惟)에 의해 사용되어 왔다.

『중약대사전』에 기술된 두충의 gutta percha는 에틸알콜이나 아세톤에 녹고, 물에는 녹지 않는 경성(硬性)의 식물성 gum인데, 나무의 부위별로 조성비가 다르다. 껍질 부위에는 6~12%, 뿌리껍질에 10~12%, 갓 돌아난 어린 잎에 3%, 열매에 27%가 들어 있다고 하였다.

한방에서 사용하는 당두충은 두충의 껍질로서 기를 보하고, 이뇨작용, 근육과 뼈를 튼튼하게 하는 강장제이며[20], 혈압강하와 콜레스테롤 수치를 낮추고 비만을 방지하는 효과가 있다는 연구 결과도 있다[21][22]. 최근 연구로는 두충이 라이소좀 효소 활성을 증가시켜 세포 스트레스를 억제하여 CC14로 인한 간의 중성지방 축적을 막는 것으로 확인하였다[23]. 또 두충차 추출액이 알루미늄에 의해 손상된 조직과 AST, ALT, LDHase, ChEase 활성도, 레닌, 알도스테론 호르몬 농도에 두충의 폴리페놀 성분이 알루미늄에 의한 중독 완화 효과가 있음을 동물 실험을 통해 확인하였다[24]. 그리고 *in vitro* 항산화 활성 분석 결과를 보면 양성 대조군인 1% Vitamin C 용액이 94% 정도의 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며 접골목, 두충, 골쇄보 군이 골담초, 우슬 군보다 유의적으로 높은 소거능을 보였다[25]. 이외에도 두충과 느릅 혼합추출물에 의한 염증 억제 효과[26], 황벽나무, 두충나무 등을 포함하는 복합수목추출물의 항균활성 및 안전성 시험[27] 등의 연구가 있었다. 그리고 가장 최근의 연구 성과로는 일본 이바라키대학 농학부 스즈키 요시히토(鈴木義人) 교수 연구진이 두충의 잎에서 기존 항암제로는 막기 어려운 암 전이와 재발의 원인이 되는 암줄기세포를 억제하는 Eucommicin A를 찾아내었다[28].

4. 연구의 필요성 및 목적

지금까지는 한방에서 이용하는 방법대로 두충의 껍질과 잎에 대해서만 연구가 진행되었다. 과거의 문헌에서 과학적인 근거를 마련하고, 유효 성분을 찾아 임상적으로 입증하는 방법으로 진행되었는데, 아직까지 수액에 대한 연구는 없었다. 두충의 수액은 한방에서 일반적으로 사용하는 약재가 아니며, 양도 너무 적게 추출되는데다, 금방 변색되므로 보관이 매우 어렵다는 점에서 연구가 되지 않았던 것으로 보인다.

두충을 채취할 때, 수액이 묻으면 비누나 세제로도 쉽게 지워지지 않은 점

에서 항산화 작용을 할 것이라 보았고(Fig. 6.), 두층이 일반적으로 병충해에 강하다는 점에서 강한 항균력이 있을 것이라 보았다. 그리고 우리나라 전통 민간요법에서 사용하는 방법으로 진액을 얻는 방법이 있는데, 독성이 충분히 검증되지 않은 상태에서 남용하는 사람도 있어 독성과 효능 확인이 필요하였다.

따라서 본 연구는 수액과 진액의 항산화 활성과 항균 활성 및 세포 독성 검사를 하여, 수액과 진액의 성분 및 효능 차이를 살펴보고 효과적인 이용 방안을 찾는 데 목적을 두었다.

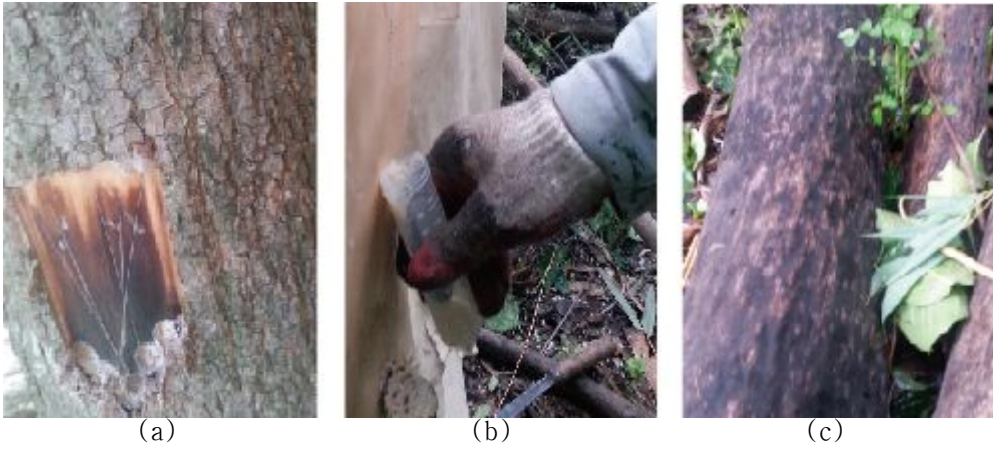


Fig. 6. Blackened by the saps

(a) after 2 hours, (b) strained glove, (c) after some days

II. 재료 및 방법

1. 두충 수액 및 진액의 유기용매 분획물 제조

가. 두충 수액 채취 및 진액의 준비

1) 두충 수액 채취

두충은 전남 화순군 도곡면에 있는 원제농원에서 유기농으로 재배한 15년 이상 된 나무 5그루로 실험하였고, 나무를 베어 수피를 제거(fig. 7.)한 뒤 수간 부위를 흐르고 있는 수액을 2015년 5월 13일, 7월 15일 총 2회에 나누어 300 ml를 직접 시약병에 담아 채취하였다(fig. 8). 수액을 채취하면서 시간이 지나면 수액이 묻은 모든 것은 검게 변색되므로 주의할 필요가 있다. 수액은 육안상으로 nectar와 유사하며, 특이한 향은 없으나 단 맛을 가지고 있다. 공기 중에서 쉽게 증발되며, 증발된 나머지 성분들은 끈끈한 검은색 찌꺼기가 남게 된다.



(a)

(b)

Fig. 7. Peeling off the layers

(a) Cutting the wood and peeling the bark, (b) Sap, flowing on the trunk



(a)

(b)

Fig. 8. Sap extract

(a) putting the sap in the vial, (b) The sap contained in the vial

2) 진액의 준비

2016년 실험에서는 충남 계룡시 엄사면에 소재한 삼전식품의 도움을 받아 옛 문헌에 의거하여 진액을 추출하는 방법을 사용했다. 보통 민간에서 사용하는 방법으로는 향아리를 땅에 묻고 또 다른 향아리에 10 kg의 두충을 물을 첨가하지 않고 두 향아리를 연결하여 그 위에 왕겨를 부어 3일을 태워 진액을 얻지만, 이렇게 하면 고온으로 유효성분이 파괴될 우려가 있어 105℃의 온도에서 24시간 동안 가열을 하여 2.5 L의 진액을 얻었다(Fig. 9.).



Fig. 9. Liguamen extract

나. 두충 수액 및 진액의 ETAC 분획

채취한 수액 150 ml을 원심 분리하여 사관 찌꺼기를 제거하고 수액 부분만을 Ethyl Acetate로 추출하였다. 수액과 Ethyl acetate를 동량으로 혼합 후 총 3회 추출하고 감압 농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 농축 후 15 mg의 추출물을 회수하였고 -80°C 에 보관 후 실험에 사용하였다.

진액은 필터링을 통해 찌꺼기와 불순물을 거른 뒤에 얻은 1 L의 진액을 다시 Ethyl Acetate로 추출해서 최종 80 mg을 확보하여 실험에 사용하였다.

본 연구에서는 두충의 수액 분획물을 E.U.S.(*Eucommia Ulmoides* Saps)으로, 진액 분획물을 E.U.L.(*Eucommia Ulmoides* Liquamen)로 칭하기로 하였다.

2. 시약

항산화 활성 분석과 세포독성 시험에 사용한 2,2-Diphenyl picryl hydrazyl (DPPH), ascorbic acid, Foline-Ciocalteau reagent와 gallic acid, Lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), Griess reagent and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-2, 5-diohenyltetrazolium bromide (MTT) 는 Sigma-aldrich Co,(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and penicillin-streptomycin은 Invitrogen (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다.

3. 항산화 효능 평가

가. 2,2-Diphenyl picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 Blois 방법을 변형하여 측정하였다[29]. 다양한 농도로 희석한 E.U.S. 10 μ l, 메탄올 90 μ l, 0.3 mM DPPH용액 100 μ l를 96 well plate에서 혼합하였다. 암실에서 30분간 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다. 흡광도 값을 계산식에 대입하여 라디칼 소거능을 확인하였다. 그리고 E.U.L.에 대해서도 같은 실험을 하였다.

$$\text{DPPH radicle 소거율 (\%)} = [1 - (\text{As}/\text{Ac})] * 100$$

As: 시료 첨가군 흡광도

Ac: 시료 무 첨가군 흡광도

나. 환원력 평가

환원력 평가는 Oyaizu 방법에 따라 측정하였다[30]. 다양한 농도로 희석한 두충 수액 추출물 200 μ l에 200 mM Sodium phosphate(pH 6.6)와 10% Potassium ferricyanide를 각각 20 μ l를 혼합 후 50 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응하였다. 반응액에 10% TCA(Trichloroacetic acid)를 200 μ l 혼합 후 10분간 원심분리 하였다. 상등액에 동량의 0.1% Ferric chloride를 섞은 후 700nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 평가하였다. 환원력 평가의 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

다. 총페놀 함량 측정

총페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다[31]. 희석한 시료 1 ml에 Folin-Ciocalteu 용액 1 ml, 10 % sodium carbonate 용액 1

ml을 혼합 후 실온에서 60분간 반응시켰다. 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군으로는 gallic acid를 사용하였다.

4. 세포 배양 및 독성 평가

가. 세포 배양

본 실험에 사용한 마우스의 대식세포주인 Raw 264.7 세포는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지에서 37°C, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다.

나. 세포 독성 평가

두충 수액 추출물의 세포에 대한 독성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)방법을 통하여 측정하였다. 96 well plate에 1×10⁶ cells/well의 세포를 분주한 후 추출물을 농도별로 처리 후 12시간동안 배양하고 100 ul MTT 시약(1 mg/ml)을 첨가하여 4시간 반응시켰다. 반응 후 MTT 시약을 제거하고 DMSO로 용해시킨 다음 570 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

다. 일산화질소 (Nitric Oxide, NO) 생성량 측정

Raw 264.7 세포를 96 well plate에 1×10⁶ cells/well로 접종 후 12시간 동안 전 배양하였다. 세포에 1 μg/ml의 LPS를 1시간 전처리하고 추출물을 농도별로 처리 후 배양하였다. 12시간 후 세포 상등액과 동량의 Griess 시약을 혼합 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 배양액 내의 일산화질소 변화를 확인하였다.

5. 두충 수액 및 진액 ETAC 분획물의 항세균 활성

가. 항세균 활성

두충 수액 및 진액 추출물의 항균 효과를 확인하기 위하여 1mg/ml의 농도로 시료를 준비한 후 다양한 그람 양성 및 음성 병원성 미생물에 대한 활성을 측정하였다. 실험에 사용한 그람 음성 병원성 미생물로는 *Alcaligenes faecalis* ATCC 1004, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Escherichia coli* KCTC 1923, ESBL(Extended-Spectrum Beta-Lactamase) P3, ESBL U4, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637, IMP(Imipenem Resistance *Pseudomonase*)120를 사용하였으며, 그람 양성 미생물로 *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, VRE(Vancomycin Resistance *Enterococcus*)5, VRE4, MRSA(Methicillin resistance *Staphylococcus aureus*) 4-5, MRSA 693E, VRSA(Vancomycin Resistance *Staphylococcus aureus*)등 총 15종의 미생물에 대한 항균력을 측정하였다.

6. 두충 수액 ETAC 분획물의 성분 분석

두충 수액 추출물의 성분을 GC/MS로 다음과 같이 분석하였다.

- 분석 시료 농도 : 1 mg/ml
- 분석 기기 : Gas chromatography/Mass spectrometer:
Agilent 7890B GC/5977A MSD
- 기기 분석 조건

Table 1. GC / MS analysis conditions apparatus

GC 조건	
Injector	Split ratio 10:1, 280°C
Carrier gas	He, 1 ml/min
Column	DB-5MS (L 30 m*0.25mm ID*0.25 μm)
Oven	50°C (2 min) → 10°C/min → 320°C (10 min)
MS 조건	
Ion source	EI, 230°C
Analyzer	Quardrupole, 150°C
Mass range	35-600 m/z (mass-to-charge ratio)

III. 결과

1. 항산화 효능 평가

가. DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능 측정은 전자나 수소를 받아 환원된 radical이 안정한 분자를 형성할 때 발생되는 원리를 이용한 방법으로 다양한 소재로부터 항산화 효능을 확인하기 위해 많이 이용되고 있다(Que F, *et al.* 2006)[32]. 두 층 수액 추출물의 DPPH 소거능 결과는 Fig. 10.과 같다. 수액 추출물의 농도를 0.001~1 mg/ml으로 희석한 후 각 농도별 소거능과 진액 추출물의 소거능을 같은 농도의 대조군인 ascorbic acid와 비교하였다.

두층수액 추출물과 진액 추출물 모두 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 유의적으로 증가하였다. 대조군인 ascorbic acid와 비교하였을 때 고농도에서 20% 정도의 소거능 차이를 나타내었지만 저농도에서는 비슷한 수준의 소거능을 나타냄을 확인하였다.

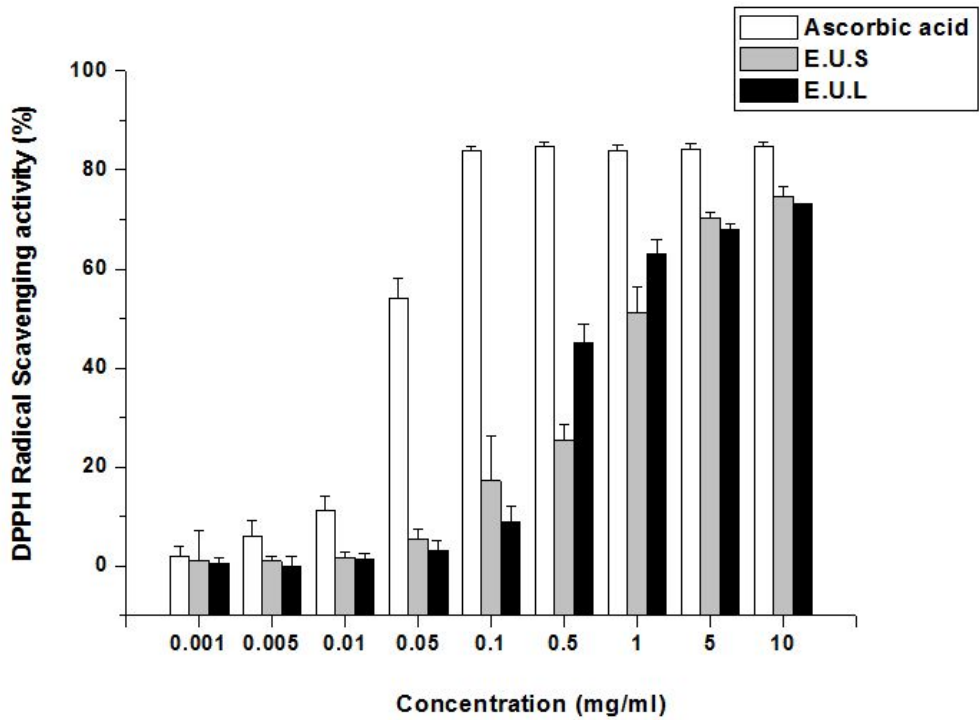


Fig. 10. DPPH radical scavenging activity of extracts in different concentrations

나. 환원력 평가

환원력은 Ferric-ferricyanide(Fe^{3+})가 수소를 공여한 후 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous(Fe^{2+})로 바뀌는 것을 700 nm에서 측정하여 흡광도 값으로 나타낸 것이다. 두충 수액 추출물의 실험 결과 1 mg/ml의 농도에서는 대조군인 ascorbic acid와 비교하였을 때 50% 정도(추출물 $\text{OD}_{700}=1.2$, 대조군 $\text{OD}_{700}=2.7$)의 환원력을 나타내었지만 0.001~0.01 mg/ml에서는 비슷한 수준의 환원력을 보였다. 진액 추출물의 경우 저농도에서 대조군보다 두 배 가량 높았으며, 고농도에서도 ascorbic acid와 비슷한 수준을 나타내었다. 그 결과 각각 추출물의 환원력은 대조군인 ascorbic acid에 비해 낮은 수치를 나타내었으나 수액보다 진액의 환원력이 뛰어난 것을 확인하였다.(Fig. 10.)

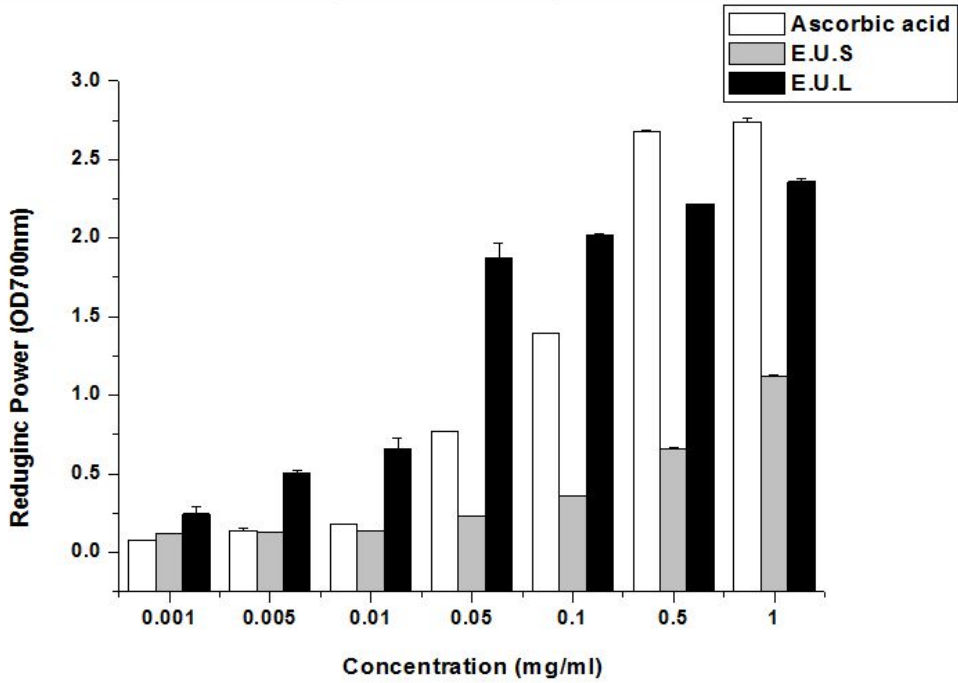


Fig. 11. Reducing power measurement

The absorbance (700 nm) was plotted against concentration of sample.

All values are mean \pm SD of triplicates.

다. 총 페놀 함량 측정

다양한 구조와 분자량을 가진 페놀성 화합물(phenolic compounds)들은 항암 및 항산화 효능과 같은 다양한 생리활성을 나타내며, 이런 화합물은 자유라디칼을 소거하여 항산화 활성에 중요한 인자로 작용한다(Balasundram *N et al.* 2006)[33]. 일반적으로 총 페놀성 함량이 증가할수록 항산화 효능이 증가한다. 두충 수액 및 진액 추출물의 총 페놀 함량은 Fig. 12.에 나타내었다. 1 mg/ml의 농도에서 대조군인 gallic acid 보다는 낮은 함량을 나타내었지만 수액 추출물에 페놀 구조를 가진 화합물이 다량으로 포함되었을 것으로 사료된다. 진액 추출물에 있어서는 수액 추출물에 비해 함량이 적게 나타났는데, 이는 가열에 의해 일부 성분이 변형된 것으로 보인다.

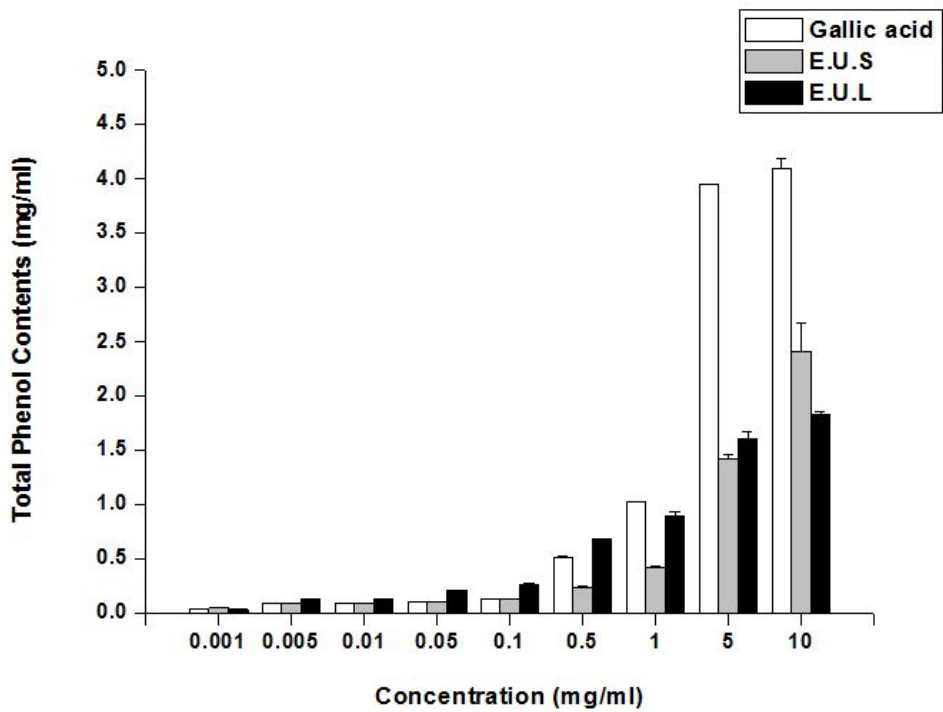


Fig. 12. The measuring of the total phenolic content

Total phenolic content was measured using the Folin–Ciocalteu method.

Absorbance values represent triplicates of different samples analysed.

2. 세포독성 및 일산화질소 생성 억제능 평가

E.U.S. 및 E.U.L.의 세포독성을 확인하기 위하여 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 시료를 처리한 후 MTT 시약을 통하여 세포생존율을 측정하였다. Raw 264.7 세포에 추출물을 0.1~10 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 후 12시간 배양하였으며 그 결과는 Fig. 13.에 나타내었다. E.U.S.을 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리 하였을 때 생존율이 40% 정도를 나타내었으며 0.1~0.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 반면에 E.U.L.의 경우 저농도인 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 50%의 생존율로 강한 독성을 나타내었다. E.U.S. 및 E.U.L.의 독성이 없는 범위 내에서 일산화질소의 생산 변화를 관찰한 결과 유효 범위에서 일산화질소 생성을 억제하지 못함을 확인하였다.

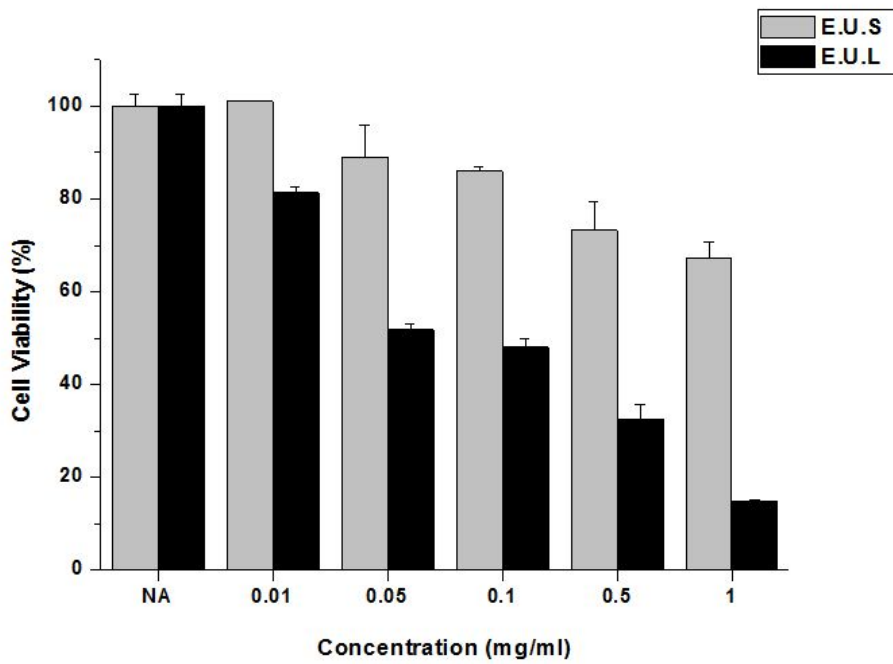


Fig. 13. The Effect on the cell viability

3. 두층 수액 및 진액 ETAC 분획물의 항세균 활성 비교

가. 항세균 활성

E.U.S. 및 E.U.L.의 병원성 미생물에 대한 항균 스펙트럼의 결과는 다음 (Table 2.)과 같다. 그람 음성 균과 일부 양성 균에서는 둘 모두 감수성이 나타나지 않았지만, 최근에 항생제 내성으로 문제가 되는 슈퍼박테리아에 대해 억제력이 있음이 나타났다. 수액 추출물의 경우 그람 양성균이 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, 항생제 내성 균주인 MRSA 693E에서 활성을 보였으며, 진액 추출물은 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, MRSA 693E, MRSA 4-5, VRSA에 뛰어난 항균 효과를 나타내었다.

Table 2. Antibacterial Spectrum

두충 수액 및 진액 추출물을 1 mg/ml의 농도로 희석 후 그람 음성 및 그람 양성 병원성 미생물에 대한 항균 활성 측정

Test organisms		단위(diameter)	
		E.U.S. (1mg/ml)	E.U.L. (1mg/ml)
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 1004	G(-)	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1925	G(-)	0	0
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1923	G(-)	0	0
ESBL P3	G(-)	0	0
ESBL U4	G(-)	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1637	G(-)	0	0
IMP120	G(-)	0	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	G(+)	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	G(+)	0	0
VRE5	G(+)	0	0
VRE4	G(+)	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	G(+)	11	13
MRSA 4-5	G(+)	0	15
MRSA 693E	G(+)	13	12
VRSA	G(+)	0	18

MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

VRE, Vancomycin resistant *Enterococcus faecium*

VRSA, Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*

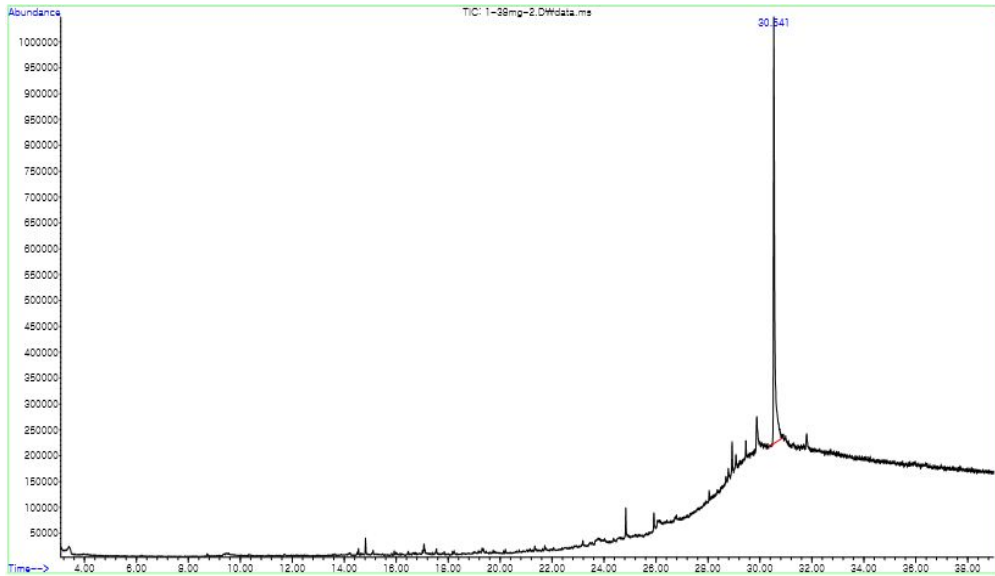
ESBL, Extended spectrum beta lactamase *Escherichia coli*

IMP, Imipenem resistant *Pseudomonase aureus*

4. 두충 수액 ETAC 분획물의 성분 분석 결과

두충 수액 추출물의 성분을 GC/MS로 분석한 결과는 다음과 같다.(Fig. 14.)

(a)



(b)

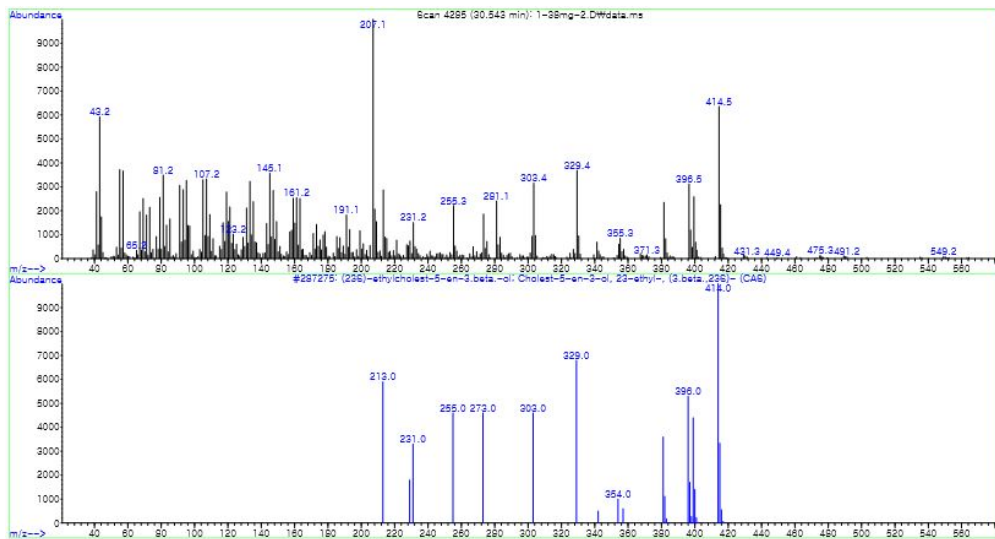


Fig. 14. Elemental analysis of the saps

■ 분석 결과

GS/MS 분석 결과 주로 들어있는 성분은 β -sitosterol과 stigmasterol 계열의 물질로 확인되었다. (Table 3.)

Table. 3. GC / MS analysis

Pk#	RT	Library/ID	CAS#	Similarity
1	30.543	Cholest-5-en-3-ol	113845-28-6	99
		gamma.-Sitosterol	000083-47-6	97
		beta.-Sitosterol	000083-46-5	97

Table 4. The comparing the effects of bark, leves and saps

	껍질	잎	수액
성분	Geniposidic acid aglycone- geniposide genipin Lignans syringaresinol- diglycoside Licoagroside F Baicalein wogonin oroxylin A Caprylic acid Triterpenoids Chlorogenic acid	Geniposidic acid Aucubin Asperuloside Quercetin rutin Licoagroside F Baicalein Wogonin Oroxylin A Lignans Syringaresinol Pinoresinol Chlorogenic Acid Ferulic acid caffeic acid	(23S)-ethylcholest-5-en-3.beta.- ol 287275 113845-28-6 99 Cholest-5-en-3-ol, 23-ethyl-, (3.beta.,23S)- (CAS).gamma.-Sitosterol Stigmast-5-en- 453605 000083-47-6 973-ol, (3.beta.,24S)- Stigmast-5-en-3.beta.-ol, (24S)- Clionasterol Fucosterol, .beta.-dihydro- 24. beta.-Ethyl-5-cholesten-3.beta.- ol beta.-Dihydrofucosterol 22,23-Dihydroporiferasterol 24S-Ethylcholest-5-en-3.beta.bet a.-Sitosterol Stigmast-5-en-3 453597 000083-46-5 97-ol, (3.beta.)- Stigmast-5-en-3.beta.-ol alpha.-Dihydrofucosterol beta.-Sitosterin
기 대 효 과	항암, 항균, 신경보호, 면역력 강화 [3]~[7]	혈압 강하, 독소 제거, 항암, 항균, 항산화 [8]~[16]	혈중 콜레스테롤 저하, 항암, 항균, AD

수액의 성분은 Table 4.과 같이 껍질과 잎에 들어있는 성분과 상이점이 있음을 확인하였다.

껍질과 잎에서는 몇 가지 성분들을 제외하고 genipin이나 Licoagroside F, Baicalein, wogonin, oroxylin A 등과 같은 물질이 중복적으로 검출되었지만, 수액은 sterol 계열을 가지고 있으며, 껍질과 잎과는 다른 성분을 가지고 있음이 나타났고, 성분이 다르므로 기대 효과 역시 차이가 있었다(Table 4.).

IV. 고찰

두충은 두충(杜仲), 목면(木棉), 사선(思仙), 사중(思仲), 사권(思僊), 면(櫛), 사운피(絲運皮), 석사선(石思仙) 등의 다양한 異名이 있다. 특징이 실처럼 늘어나는 특성이 있는데, 약명을 絲로 하지 않고, 思로 한 것은 중국어로 두 글자의 음가가 Si로 같기 때문으로 보인다.

약 3,000년 전 기록된 신농본초경(神農本草經)에 두충(杜沖)은 맥문동, 인삼, 황기, 감초, 지황 등과 함께 상경(上經)으로 분류될 정도로 귀한 한약재로 분류되었는데, 허리 디스크나 요통, 소화강장, 근육과 뼈의 강화, 건망증, 노화방지 등(杜仲 : 味辛平, 主 腰脊痛, 補中, 益精氣, 堅筋骨, 強志, 除陰下痒溼, 小便餘瀝, 久服 輕身, 耐老, 一名 思僊, 生山谷.)에 효과가 있다 하였다[34]. 이런 근거로 두충은 중국 중서부 지방에서만 생육하며 정부에 의해 보호종으로 묶여 약재로만 일부 수출을 해왔는데, 1926년 당시 임업시험장 촉탁이며 동경대학 교수였던 中井猛之進(나카이 다케노신) 박사가 우리나라에 최초로 도입하여 홍릉 수목원에 식재하였고, 그 후 이 모수(母樹)로부터 전국 각지에 식재되어 왔다고 한다.

중국을 중심으로 하는 동양에서는 실험이나 경험에 의해 약효를 분석하기 보다, 그것의 생긴 모양이나, 자라는 환경을 음양오행설이나 철학적인 사유를 통해 약효를 결정했고, 그 후에 경험을 축적해 보강하는 방법을 사용해왔다. 두충이라는 약재도 오래 먹으면 신선이 된다는 허무맹랑한 이야기도 가지고 있었고, 실처럼 늘어나는 gutta percha를 보고 근육이나 뼈를 강하게 할 것이라는 관념론에서 약재를 사용해 온 것이다. 그러나 현대에 들어서 과학적인 성분 분석을 통해 구체적인 약효와 부작용의 사례를 더욱 명확하게 찾을 수 있었다.

한방과 민간에서 가장 많이 사용하는 두충의 부위는 껍질과 잎이며, 연구도 가장 많이 이루어져 왔다. 그러나 아직까지 수액에 대한 연구는 없었으며

로 본 연구에서는 수액과 진액 추출물로 연구를 진행하였다.

우선 수액이 가장 많이 나오는 때는 껍질을 채취하는 때와 일치하였으며, 진액의 채취는 계절과 상관없으며, 일반 약재로 사용하고 버려지는 부위에서도 진액의 추출은 가능했다. 민간에서는 3일 정도 고온에서 채취를 하고, 1년 이상 숙성을 시켜 맑은 식초를 사용하고 있지만, 본 연구에서는 수액과 진액으로만 실험을 진행하였다.

결과에 나타났듯이 수액의 경우에는 진액에 비해 세포 독성은 약하였지만, 항산화력이나 환원력, 항균력에 있어서 진액과 비교했을 시 효능이 좋지 않음을 확인하였다. 그러나 진액의 경우에 환원력과 MRSA, VRSA에 대한 항균력은 유의미한 것으로 나타났다. 독성이 나타나지 않는 농도와 용량 내에서 환원력과 항균력에 대한 최대 효과를 규명하는 실험이 요구되는 바이다.

껍질과 잎의 성분과는 다르게 수액에서는 β -sitosterol과 stigmasterol이 나타났다.

β -sitosterol은 대부분의 식물에 들어 있는 성분으로 흡수는 어렵지만 cholesterol 흡수를 저해하는 작용으로 혈중 cholesterol의 감소를 통해 심장 질환의 예방과 함께, 2형 당뇨병 환자의 혈당을 조절하는데 기여하는 것으로 알려져 있다. 또한 암세포의 증식을 억제하는 효과와 항균, 항염, 항산화, 항퀘양이나 항암의 효과가 있어 대장암이나 전립선 비대증, 위암 등의 임상에 사용되고 있다[35][36].

여러 식물성 스테롤 성분들 가운데서도 stigmasterol은 β -secretase의 활동을 직접 감소시키고, 모든 γ -secretase 성분의 발현을 줄여주며, cholesterol과 amyloidogenic APP 분열과 연루된 lipid rafts에서의 presenilin 배포를 감량시키며, APP β -secretase의 분열에 포함된 endosome 막에 대해 BACE1의 internalization을 감소시킴으로써 A β generation을 감량하였고 결과적으로 알츠하이머 질병에 유효하다는 연구 [37]가 있었으며, 이외에도 우수한 항암 효과로 결장암, 유방암, 전립선암,

난소암 등에 효과가 있는 것으로 나타났고, 진통과 해열 작용에도 유효함이 입증되었다.

수액을 채취하는 나무는 주로 고로쇠 나무(*Acer mono Max.*)나 대나무(*Phyllostachys pubescens*), 옷나무(*Rhus verniciflua*, *Toxicodendron vernicifluum*) 등이 있는데, DPPH radical 소거능이 대조군(ascorbic acid)의 20% 수준이었고, 환원력은 대조군의 수준을 넘지 못하였던 것으로 나타났다.[38][39] 세포 독성은 대체로 모두 안전한 수준이었으나, 옷나무는 urushiol 성분 때문에 독성이 강한 것으로 나타났다[40]. 한편 두층의 진액 추출의 방법으로 대나무의 진액을 추출한 것을 죽력(竹瀝)이라 부르는데, 죽력 역시 고농도(50 $\mu\text{m}/\text{ml}$)에서 ascorbic acid와 비슷하였을 뿐, 저농도에서는 20 %에 머물렀다[41]. 동일한 조건에서의 실험이 뒤따라야 할 것이다.

총페놀 함량 측정의 경우, 율혜경의 천연약용식물의 생리기능성과 기능성 식품소재로서의 특성에 관한 연구[42]에 따르면, 두층의 껍질은 삼백초(59.39 mg/g), 어성초(27.32 mg/g), 지구자(25.6 8mg/g)보다 높진 않지만 17.1 mg/g 들어있는 것으로 나타났다 하였는데, 이는 5 mg/ml 이상 농도의 수액과 같다는 것을 알 수 있었다.

보통 수령 15년 이상의 두층을 벌목해 껍질만 사용하는데, 껍질을 벗긴 나머지 부위는 금방 변색되어 다른 용도로 이용하지 못하고 버려지고 있었는데, 수액과 진액의 추출이 이루어진다면 좀 더 나올 것이다. 또한 진액 추출물에 대한 오남용을 막고 적정 용량을 지정해야 할 것이다. 이를 토대로 지속적인 연구가 뒷받침되고, 항염과 항암, AD 치료제 등의 개발 연구를 위한 자료로 유용하게 활용될 수 있으리라 생각한다. 그리고 진액추출물을 이용한 슈퍼박테리아에 대한 천연 항균제로의 활용 역시 기대할 수 있을 것이다. 항산화 작용을 통한 피부 노화 방지나, 쉽게 착색되는 성분을 이용해서 천연 염색약으로 이용해도 좋을 것이라 기대된다.

V. 결론

두충은 예전부터 한방에서 자주 사용하던 약재로서, 일반적으로 염초(鹽炒)한 후 사용해왔으나, 본 연구에서는 두충의 수액과 진액을 추출하여 약리 활성을 분석하였다.

각각의 수액과 진액의 효능을 알아보기 위해 DPPH 라디칼 소거능과 환원력, 총페놀 함량을 측정하여 항산화 효능을 확인하였고, 세포 독성과 일산화질소 생성량을 측정하였으며, 병원성 미생물에 대한 항균력을 분석하였다. 그리고 수액의 성분 에 대해서 알아보았다.

각각의 결과는 다음과 같다.

1. 라디칼 소거능에 있어서 고농도(1~0.05 mg/ml)의 수액과 진액은 ascorbic acid에 비해 80~30%의 효과를 보였으나, 저농도에서는 대조군과 유사하였다. 대체로 α -tocopherol과 유사한 정도의 항산화능을 나타내고 있음을 알 수 있다.
2. 환원력에 있어서 수액은 ascorbic acid에 비해 고농도에서는 50% 성능을 보였고, 저농도에서는 거의 비슷하였지만, 진액 추출물의 경우 대조군에 비해 매우 우수한 환원력을 나타내었다. 0.001~0.01 mg/ml에서는 비슷한 수준의 환원력을 나타내었고, 진액은 0.5 mg/ml이상의 고농도에서는 대조군과 거의 같은 수준이었으며, 0.1이하 저농도에서는 두 배 이상의 환원력을 나타내었다.
3. 총 페놀 함량은 대조군인 gallic acid에 비해 높지 않았으며, 진액의 경우엔 오랜 시간 가열을 해 페놀 함량이 훨씬 적게 나타났지만, 페놀 구조를 가진 화합물이 다량 포함되었을 것으로 생각한다.
4. 세포 독성 실험에 있어서는 수액 추출물에서의 생존율은 높았지만, 고농도(농축을 0.01 mg/ml 이상)의 진액 추출물에서는 독성을 나타내었으며, 독성이 없는 범위 내에서의 항염증 효능은 나타나지 않음을 확인하였다. 고

용량으로 이를 섭취하는 경우 부작용이 발생할 것으로 사료된다.

5. 병원성 미생물에 대한 항균 활성 분석 결과 그람 음성균인 *Alcaligenes faecalis* ATCC 1004, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Escherichia coli* KCTC 1923, ESBL P3, ESBL U4, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637에 대해서는 수액과 진액 모두 감수성이 없었는데, 그람 양성균 중에서 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, MRSA 4-5, MRSA 693E, VRSA 에서는 Table 2.와 같이 수액 추출물에 비해 진액 추출물의 효능이 우수한 것으로 확인되었다.
6. 두층 수액 추출물을 GS/MS를 통하여 분석한 결과 식물성 sterol 계열의 성분과 유사하며, 주로 β -sitosterol과 stigmasterol이 들어있어 혈중 콜레스테롤 저하와 항암, 항균, AD에도 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료된다.

지금까지 현대의학을 비롯해 한의학과 중의학에서는 껍질과 잎에 대해서만 연구를 했지만, 본 연구에서는 수액과 진액 추출물에서 위와 같은 효과가 있음을 밝혔다. 두층의 수액과 진액을 비교했을 때, 환원력과 슈퍼박테리아 항균력에서 진액의 효과가 더 높은 것으로 나왔으나, 세포 독성의 문제가 남아 있다. 향후 이를 보완하는 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

VI. 참고문헌

- [1] 張仲景, 『傷寒雜病論桂林古本』, 朔雪寒, 2014 : 2
- [2] 김창민, 『한약재감별도감』, 아카데미서적, 2015
; <http://terms.naver.com/list.nhn?cid=55567&categoryId=55568>
- [3] Liu E, et al, “Eucommia ulmoides bark protects against renal injury in cadmium-challenged rats”, **Journal of medicinal food**, 2012 : 307-14
- [4] Shi J, et al, “Structure identification and fermentation characteristics of pinoresinol diglucoside produced by *Phomopsis* sp. isolated from *Eucommia ulmoides* Oliv.”, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012 : 1475-83
- [5] Shi SY, et al, “Combination of preparative HPLC and HSCCC methods to separate phosphodiesterase inhibitors from *Eucommia ulmoides* bark guided by ultrafiltration-based ligand screening”, **Analytical and bioanalytical chemistry**, 2013 : 4213-23
- [6] Chai X, et al, “A rapid ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the qualitative and quantitative analysis of ten compounds in *Eucommia ulmoides* Oliv.”, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2012 : 52-61
- [7] Ong VY, et al, “Novel phytoandrogens and lipidic *a*ugmenters from *Eucommia ulmoides*”, **BMC Complement Altern. Med.** 2007 :
<http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-7-3>

- [8] Dai X, et al, “Preparative isolation and purification of seven main antioxidants from *Eucommia ulmoides* Oliv. (Du-zhong) leaves using HSCCC guided by DPPH-HPLC experiment”. **Food Chemistry**, 2013 : 563-70
- [9] Zhang Q, et al, “Seasonal difference in antioxidant capacity and active compounds contents of *Eucommia ulmoides* oliver leaf” **Molecules**, 2013 : 1857-68
- [10] “Inhibitors of Prion Protein 5' UTR mRNA Measured in Cell-Based System Using Plate Reader - 2078-01_ Inhibitor_SinglePoint_ HTS_ Activity” :
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/488862#section=Top>
- [11] Yang K, et al, “Protective effect of *Aucuba japonica* against carbontetrachloride induced liver damage in rat”. **Drug Chemistry Toxicol**, 1983 : 429-441
- [12] Zheng J, et al “Enzymatic extraction and antibacterial activity of aucubin from *Eucommia ulmoides* leaves”, **Zhong Yao Cai**, 2012 : 304-6
- [13] Takamura, Chika, “Studies on the chemical constituents of green leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv.”, **Journal of Natural Medicines**, 2007 : 220-1
- [14] Fujikawa T, et al, “Chronic administration of *Eucommia* leaf stimulates metabolic function of rats across several organs“ **British**

Journal of Nutrition (2010), 104, 1868-7

- [15] Deyama T, et al, “The constituents of *Eucommia Ulmoides* Oliv VI. Isolation of a new sesquilignan and neolignan glycoside.” **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** Vol. 35 (1987) No. 5 P 1803-7 35:1803.
- [16] Li H, et al, “Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv.(*E. ulmoides*)”, **Ultrasonics Sonochemistry** Vol. 12, 2005 : 295-300
- [17] 李時珍, 『本草綱目』, 中國醫學大系, 1990, 권 42 : 46
- [18] 許浚, 『東醫寶鑑』, 여강출판사, 1994 : 3062
- [19] 黃道淵, 『大方藥合編』, 행림출판사, 1977 : 225
- [20] 박성진, et al, “두충잎의 첨가가 육계의 성장 및 육질에 미치는 영향”, 『한국가금학회지』 . 1996 : 23-71.
- [21] Metroi K, et al, “The prevention effect of ginseng with Du-Zhong leaf on protein metabolism in aging”, **Biological and Pharmaceutical Bulletin** Vol. 20 (1997) : 237-42
- [22] Nakasa T, et al, “Effects of du-zhong [*Eucommia ulmoides*] leaf extract on plasma and hepatic lipids in rats fed on a high fat plus high cholesterol diet”, **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, 1995 : 1491
- [23] 김창봉, “쥐에서 두충에 의한 CC14로 유도된 급성간 지방 축적 조절 기

- 전”, 전북대학교 일반대학원 학위논문: 의학 2013. 2
- [24] 한성희, “두충차 추출액이 알루미늄 투여 흰 쥐의 알루미늄 축적률과 각종 장기 기능에 미치는 영향”, **한국식생활문화학회지** 제25권 제6호, 2010 : 839
- [25] 이수현, “자원식물 5종 (접골목, 골담초, 두충, 우슬, 골쇄보) 열수 추출물의 갱년기 이후 당질, 지질 및 골 대사 개선 효능 검증”, **경북대학교 보건학 학위논문**, 2015
- [26] 권희정 외 5 명, “두충과 느릅 혼합추출물에 의한 염증 억제 효과”, **방사선산업학회지** 제6권 1호, 2012 : 11-15
- [27] 김현우 et al, “황벽나무, 두충나무 등을 포함하는 복합수목추출물의 항균활성 및 안전성 시험”, **화학공학회지** 제51권 제5호, 2013 : 536-539
- [28] Fujiwara, M. et al “Eucommicin A, a β -truxinate lignan from *Eucommia ulmoides*, is a selective inhibitor of cancer stem cells A”, **Phytochemistry Ayaka**, 2015 : 139-45
- [29] Blois. M. S. “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, **Nature** 26, 1958 : 1199.
- [30] Oyaizu M. 1986. “Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine”. **Japanese Journal of Nutrition**, 44:307-315
- [31] Zhang Q, et al, “A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds”, **Journal of Applied Phycology**

18, 2006 : 445-50.

[32] Que F, et al, “Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles”, **LWT- Food Science and Technology**, 39, 2006:111-7

[33] Balasundram N, et al, “Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses”, **Food Chemistry**, vol. 99, 2006 : 191-203.

[34] 吳普, 『神農本草經』, 의성당, 2003

[35] 최영득, “전립선비대증 환자에 있어 Beta-Sitosterol의 임상효과”, **Korean Journal of Urology** 31,2, 1990 : 209-13

[36] Seung-Lark Hwang, et al, “Beneficial effects of beta-sitosterol on glucose and lipid metabolism in L6 myotube cells are mediated by AMP-activated protein kinase”, **Biochemical and Biophysical Research Communications** Vol. 377 No. 4, 2008 : 1253-61

[37] Verena K. Burg, et al. “Plant Sterols the Better Cholesterol in Alzheimer's Disease? A Mechanistical Study”, **The Journal of Neuroscience**, 9 October 2013 : 33-41

[38] 설은경, “고로쇠(*Acer mono Max.*) 추출물의 항산화 효과”, 숭실대학교 중소기업대학원 뷰티산업학과 석사학위논문, 2012 : 36

[39] 조숙현 외, “대나무수액의 활성산소 소거활성과 세포독성”, 한국식품저장유통학회지 제 15권 제 1호, 2008 : 105-10

[40] 이진숙, “옻나무(*Rhus verniciflua*, *Toxicodendron vernicifluum*) 유래의 Flavonoids 항산화 활성”, 아주대학교 대학원 생명과학과 석사학위논문, 2002

[41] 박관희, “Whitening and Anti-oxidative Activity and Inhibitory Activity on Nitric Oxide Production of Phenolic Compounds from *Bambusae Caulis in Liquamen*”, 중앙대학교 대학원 약학과 석사학위논문 2008 : 46

[42] 윤혜경, “천연약용식물의 생리기능성과 기능성 식품소재로서의 특성에 관한 연구”, 고신대학교 교육대학원 영양교육학 석사학위논문, 2006 : 39

VII. 감사의 글

두층만 아니라 많은 약초에 대해 동양의학으로 공부해오던 제게는 약리학 적 분석이 매우 어려운 길이었습니 다. 그러나 저를 아껴주시고 체계적으로 지도하시며, 관심을 가져주신 지도교수님께 가장 먼저 감사의 글을 올립니다. 덕분에 편견을 극복하고 약리학적인 시각을 갖게 되었습니다. 매 실험마다 꼼꼼하게 지도해주셨고, 수액이 나오지 않아 애가 탈 때도 응원해 주셨으며, 안목을 넓혀주어 이 논문을 쓰게 되었습니다.

바쁜 일정에도 불구하고, 논문을 심사해주신 이미자 교수님, 소금영 교수님, 광주대학교 이효정 교수님, 목포대학교 조승식 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

또한 보완대체의학 박사과정 동안 열정적으로 지도해 주신 서재홍 총장님, 김종중 교수님, 박상학 교수님, 박 종 교수님, 양남웅 교수님, 홍 란 교수님, 김복희 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

이 논문이 나오기까지 처음부터 끝까지 도움을 주셨던 약품 미생물학 최윤희 박사님께도 많은 고마움을 전합니다. 실험에 도움을 주신 화순의 원제농원과, 계룡시 엄사면의 삼전식품에도 감사의 말씀을 전합니다. 돌이켜보면 부모님과 저희 식구들의 도움과 보조가 있지 않았으면 어려웠을 것 같습니다. 이 논문은 저의 노력보다 이런 분들의 공이 훨씬 크게 느껴집니다.

제가 이 모든 분들의 은혜에 보답하는 길은 이 논문에서 그칠 게 아니라 더욱 연구를 거듭하여 지역 사회에 이바지하는 일이라 생각합니다. 이를 항상 마음에 새기며 살아가겠습니다. 도움주신 여러분들께 다시 한 번 더 감사의 글을 전합니다.