



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**동일조건변경허락.** 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

2006年 2月  
博士學位 論文

유근피 추출물이 흰쥐의 항산화계  
및 지질대사에 미치는 영향

*Effect of Ulmus davidiana var. japonica Nakai  
Ethanol Extract on Antioxidative System and  
Lipid Metabolism of Rats*

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

鄭 昌 珠

유근피 추출물이 흰쥐의 항산화계  
및 지질대사에 미치는 영향

*Effect of Ulmus davidiana var. japonica Nakai  
Ethanol Extract on Antioxidative System and  
Lipid Metabolism of Rats*

2006年 2月 日

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

鄭 昌 珠

유근피 추출물이 흰쥐의 항산화계  
및 지질대사에 미치는 영향

指導教授 李 明 烈

이 論文을 理學博士學位申請 論文으로 提出함


2005年 10月 日


朝鮮大學校大學院


食品營養學科


鄭 昌 珠


鄭昌珠의 博士學位 論文을 認准함

委員長 全南大學校 農學博士 高武錫 

委員 木浦大學校 農學博士 朴亮均 

委員 朝鮮大學校 農學博士 張海春 

委員 木浦大學校 農學博士 金仁澈 

委員 朝鮮大學校 藥學博士 李明烈 

2005年 12月 日

朝鮮大學校 大學院

# 목 차

<i>ABSTRACT</i> .....	x
제1장 서 론 .....	1
제2장 재료 및 방법 .....	6
제1절 실험재료 .....	6
제2절 성분분석 .....	6
1. 일반성분 .....	6
2. 유리당 .....	6
3. 아미노산 .....	7
4. 지방산 .....	8
5. 비타민 A 와 비타민 E .....	9
6. 유기산 .....	10
7. 무기질 .....	11
8. 양·음이온 .....	12
제3절 항산화 효능 실험 .....	14
1. 시약 .....	14
2. 실험기기 .....	15
3. 시료추출 .....	15
가. 에탄올 추출 .....	15
나. 다용매 분획 추출 .....	16
4. <i>In vitro</i> 에서 항산화활성 .....	18
가. DPPH radical 소거작용 .....	18

나. 항산화지수(active oxygen method(AOM)- Rancimat측정) .....	18
다. 아질산염 소거 작용(nitrite scavenging ability, NSA) .....	19
라. Linoleic acid에 대한 항산화 작용 .....	19
마. 지질과산화물 생성 억제 작용(TBARS) .....	20
5. <i>In vivo</i> 에서 항산화효능 .....	20
가. 실험동물 .....	20
나. 에탄올추출물 및 알코올 투여 .....	21
다. 체중 및 식이섭취량 .....	21
라. 실험동물 처치 .....	21
마. 효소활성 .....	23
(1) 효소원 조제 .....	23
(2) XO 활성 .....	23
(3) SOD 활성 .....	24
(4) Catalase 활성 .....	24
(5) GSH-Px 활성 .....	24
(6) TBARS 함량 .....	25
(7) GSH 함량 .....	25
(8) 단백질 정량 .....	26
바. 혈청 중의 AST, ALT, ALP 활성 .....	26
사. 통계처리 .....	26
제4절 고지혈증 억제효능 실험 .....	27
1. <i>In vitro</i> 에서 고지혈증 억제 효과 측정 .....	27
가. LDL의 분리 .....	27
나. LDL 산화 억제 효과 .....	27
2. <i>In vivo</i> 에서 고지혈증 억제효능 실험 .....	28
가. 실험동물의 사육 및 식이 .....	28

나. 실험동물의 처리 .....	30
다. 혈청 중 효소활성 .....	30
라. 혈청 중 지질함량 .....	31
마. 간장 중 지질함량 .....	31
<b>제3장 결과 및 고찰 .....</b>	<b>32</b>
제1절 성분분석 .....	32
1. 일반성분 .....	32
2. 유리당 .....	33
3. 구성아미노산 조성 .....	33
4. 지방산 조성 .....	34
5. 비타민 A 및 E .....	36
6. 유기산 .....	36
7. 무기질 .....	37
8. 양 · 음이온의 .....	37
제2절 항산화 효능 .....	39
1. <i>In vitro</i> 에서 유근피 에탄올 분획의 항산화 활성 .....	39
가. DPPH radical 소거작용 .....	39
나. 항산화지수(AOM) .....	41
다. 아질산염 소거작용 .....	43
라. 지질과산화에 생성억제 작용 .....	43
마. Linoleic acid에 대한 항산화 작용 .....	45
2. <i>In vivo</i> 에서 유근피 에탄올 추출물의 항산화 효능 .....	46
가. 체중증가율 및 식이효율 .....	46
나. 간 조직 중 항산화 효소 활성 .....	49
(1) 유리기 생성계 효소(XO)활성 .....	49



(2) 유리기 해독계 효소(SOD, catalase 및 GSH-Px)활성 .....	51
다. 간 조직 중 과산화지질 함량 .....	55
라. 간 조직 중 GSH함량 .....	57
마. 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성 .....	59
제3절 고지혈증 억제 효능 .....	63
1. <i>In vitro</i> 에서 고지혈증억제 효과 .....	63
가. LDL에 대한 항산화 효과 .....	63
2. <i>In vivo</i> 에서 고지혈증억제 효능 .....	65
가. 체중증가율, 식이효율 간장/체중비율 .....	65
나. 혈청 중 중성지질, 총콜레스테롤 및 인지질 함량 .....	69
다. 혈청 중 유리콜레스테롤, 콜레스테릴 에스테르농도 및 콜레스테릴 에스테르 비율 .....	73
라. 혈청 중 LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 심혈관 위험지수 (CRF) 및 동맥경화지수 .....	77
마. 혈청 중 ALT, AST 및 ALP활성 .....	83
바. 간장 총 콜레스테롤 및 중성지질 농도 .....	87
 제4장 요약 .....	 91
 제5장 참고 문헌 .....	 94

## LIST OF TABLES

Table 1. Operating condition of ion chromatography for free sugars .....	7
Table 2. Operating condition of amino acid autoanalyzer for amino acids .....	8
Table 3. Operating condition of gas chromatography for fatty acids .....	9
Table 4. Operating condition of high performance liquid chromatography for vitamin A and E .....	10
Table 5. Operating condition of ion chromatography for organic acids .....	11
Table 6. Operating condition of atomic absorption spectrophotometer for minerals .....	12
Table 7. Operating condition of ion chromatography for cations .....	13
Table 8. Operating condition of ion chromatography for anions .....	13
Table 9. Yield of Ethanol extract and its solvent fraction from dried <i>Ulmus dividiana var. japonica</i> .....	16
Table 10. Composition of experimental diet and groups .....	22
Table 11. Composition of experimental diet containing cholesterol .....	29
Table 12. Composition of experimental groups .....	30
Table 13. Proximate compositions of <i>U. davidian var. japonica</i> .....	32
Table 14. Contents of free sugars in <i>U. davidian var. japonica</i> .....	33
Table 15. Contents of total amino acids in <i>U. davidian var. japonica</i> .....	34
Table 16. Composition of fatty acids of <i>U. davidian var. japonica</i> .....	35
Table 17. Contents of vitamin A and E in <i>U. davidian var. japonica</i> .....	36
Table 18. Contents of organic acids in <i>U. davidian var. japonica</i> .....	36

Table 19. Contents of minerals in <i>U. davidian</i> var. japonica .....	37
Table 20. Contents of cations in <i>U. davidian</i> var. japonica .....	38
Table 21. Contents of anions in <i>U. davidian</i> var. japonica .....	38
Table 22. Scavenging effects of UDEE fractions on DPPH radical .....	40
Table 23. Antioxidative activities of UDEE fractions on soybean oil .....	42

## LIST OF FIGURES

Fig. 1. Scheme for extraction and fractionation of antioxidants from <i>Ulmus dividiana</i> var. <i>japonica</i> .....	17
Fig. 2. Nitrite scavenging activity of UDEE fractions under different pH conditions .....	44
Fig. 3. Lipid peroxidation inhibitory activities of fractions of UDEE .....	44
Fig. 4. Change of peroxide value in linoleic acid emulsion added fractions of UDEE during incubation at 50 °C for 10 days .....	45
Fig. 5. The growth rate in alcohol and/or UDEE administered rats .....	47
Fig. 6. The FER in alcohol and/or UDEE administered rats .....	48
Fig. 7. Activities of XO in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE .....	50
Fig. 8. Activities of SOD in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE .....	52
Fig. 9. Activities of catalase in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE. ....	53
Fig. 10. Activities of GSH-Px in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE .....	54
Fig. 11. Contents of TBARS in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE .....	56
Fig. 12. Contents of GSH in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE .....	58
Fig. 13. Activities of ALT in the serum of rats administered alcohol and/or UDEE .....	60

Fig. 14. Activities of AST in the serum of rats administered alcohol and/or UDEE .....	61
Fig. 15. Activities of ALP in the serum of rats administered alcohol and/or UDEE .....	62
Fig. 16. The inhibitory effect of UDEE fractions on LDL oxidation .....	64
Fig. 17. The change of growth rate of the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	66
Fig. 18. The FER of the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	67
Fig. 19. Effect of UDEE diets on liver weight of rats fed high cholesterol diet .....	68
Fig. 20. Contents of triglyceride in the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	70
Fig. 21. Contents of total cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	71
Fig. 22. Contents of phospholipid in the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	72
Fig. 23. Contents of free cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	74
Fig. 24. Contents of cholesteryl ester in the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	75
Fig. 25. Ratio of cholesteryl ester ratio in the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	76
Fig. 26. Contents of LDL- cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	79
Fig. 27. Contents of HDL- cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	80

Fig. 28. Ratio of CRF in the rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	81
Fig. 29. AI of rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	82
Fig. 30. Activities of ALT in the serum of rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	84
Fig. 31. Activities of AST in the serum of rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	85
Fig. 32. Activities of ALP in the serum of rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	86
Fig. 33. Contents of total-lipid in the liver of rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	88
Fig. 34. Contents of triglyceride in the liver of rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	89
Fig. 35. Contents of total cholesterol in the liver of rats fed high cholesterol diet with UDEE .....	90

# ABSTRACT

## *Effect of Ulmus davidiana var. japonica Nakai Ethanol Extract on Antioxidative System and Lipid Metabolism of Rats*

Jung, Chang-Joo

Advisor : Prof. Lee, Myung-Yul, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

This study was performed to investigate the effect of ethanol extract of *U. davidiana var. japonica* Nakai (UDEE) on antioxidant activities and lipid metabolism in the liver of rats.

### *The results obtained were as follows :*

1. In *U. davidiana var. japonica*, fructose was major in free sugars, aspartic acid in amino acids, palmitic acid in fatty acids, formic acid in organic acids, calcium in minerals,  $\text{Ca}^{++}$  in cations and  $\text{NO}_3^-$  in anions, respectively.
2. On antioxidative activity of UDEE *in vitro*, n-butanol fraction was the highest among fractions, and activity of nitrite scavenging was the

highest at pH 1.2, and the peroxide value for linoleic acid was increased during the storage.

3. In scavenging effect of oxygen free radicals generated in the ethanol-induced hepatotoxicity in the liver of rats,

① The growth rate of the rats was decreased by ethanol administration, however, was gradually increased to a little lower level than the normal group by administering UDEE.

② It was also observed that the activities of superoxide dismutase(SOD) increased by ethanol were markedly decreased in UDEE administered group as compared with control group. The glutathione(GSH) contents were decreased by ethanol administration, however, increased after administering UDEE.

4. In antihypercholesterolemic effect of UDEE on the levels of lipid in serum and the liver of rats fed high cholesterol diet,

① The growth rate of the hypercholesterolemic group(control group) was higher than the normal group, whereas the groups administered UDEE were decreased. The liver weight in control group was significantly higher than that of normal group, but that of control group with UDEE administration was lower than control group.

② The activities of alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) and alkaline phosphatase(ALP) in serum were rather lowered in the UDEE administration group than in the cholesterol administered group.

③ Contents of total cholesterol and LDL-cholesterol of in serum were



lower in UDEE administration groups than control group while those of HDL-cholesterol were higher.

UDEE increased HDL-C/T-C ratio and lowered atherogenic index. Triglyceride content was not decreased significantly during 6 weeks of experiment, but the contents of free cholesterol and cholesteryl ester were significantly decreased in UDEE administrated groups than control group. The phospholipid content in serum was not affected significantly by UDEE, but it was gradually increased. The hepatic contents of total cholesterol and triglyceride were lowered in UDEE administrated groups than control group.

These results suggest that ethanol extract of *U. davidian var. japonica* have a possible positive effect on the liver function in hepatotoxicity-induced rats by ethanol administration, and the fatty liver in hyperlipidemia-induced rats by high cholesterol administration.

## 제1장 서론

다양화되는 현대 생활 속에서 알코올의 만성적 혹은 과량 섭취로 인하여 간 질환을 포함한 알코올과 관련된 만성 퇴행성 질환의 발명 등이 사회문제화 되고 있다(1).

알코올은 그 독성의 일차적 대상이 간세포라는 점에서 알코올에 의한 간세포의 형태학적 변화에 관한 연구가 이루어져왔다(2). 알코올은 단시간에 과량을 섭취하면 간의 여러 가지 기능 즉 지질 산화나 소포체에서의 약물대사 등이 방해 받게 되고, 만성적으로 알코올을 섭취하면 적응성이 생겨 초기에는 MESO(microsomal ethanol oxidizing system)이 유발되어 알코올 및 약물의 대사가 증가하고 지단백질의 생성이 가속화되지만, 지속적인 알코올 섭취는 간세포의 손상을 가져온다. 과량의 알코올 섭취가 유해한 것은 알코올 그 자체보다는 산화과정에서 생성된 acetaldehyde와 과량의 수소(NADH)에 기인하다(3) 알코올 산화로 생성된 대부분의 acetaldehyde는 acetate로 산화되지만 acetaldehyde는 농도가 16 mM이상일 때는 생성된 acetaldehyde는 간세포에 극히 유해한 물질로서 미토콘드리아의 기능을 저해하여 만성적인 알코올 섭취 시 유발되는 간염이나 간경변증 등의 근본적인 원인이 될 뿐만 아니라 aldehyde dehydrogenase의 활성을 감소하고 비타민의 활성화를 저해하여 혈중 비타민의 양을 강화시키고 심장의 근육 단백질의 합성도 억제한다. 뿐만 아니라 과량의 NADH는 간세포의 화학적 평형을 저해하고 대사 이상을 초래한다(4)

알코올이나 그 대사산물에 의해 발생된 free radical의 생성에 의한 지질과산화 형성이 간세포 파괴 및 섬유화에 관여한다(5). 이렇게 생성된 유리산소는 고등생물이나 호기성 미생물의 호흡에서 산소가 불안정하게 환원되면 생성된다.

유기체의 생명 유지에 필수적인 산소가 생명체내에서 활성화되면 매우 독성이 강한 과산소( $O_2 \cdot^-$ , superoxide anion)로 전환된 후 superoxide는 다시  $H_2O_2$ , hydroxyl radical( $\cdot OH$ ),  $^1O_2$ (singlet oxygen)로, 활성산소는 산화력이 매우 강하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하게 되며 (6), 이러한 산화 스트레스는 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암을 비롯한 다양한 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(7). 이로 인하여 생체 내 free radical의 생성을 억제하는 것이 질병예방을 위한 중요한 과제로 대두되고 있으며 이러한 추세에 따라 노화억제에 대한 연구의 일환으로 생체 내 자유 라디칼의 생성을 억제하는 항산화물질에 대한 연구가 수행되고 있다(8-10).

사람과 동물에는 이러한 산화적 손상을 예방하거나 복구하는 체계를 갖고 있으며 superoxide dismutase(SOD), reduced glutathione(GSH), glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione S-transferase(GST), catalase 등이 여기에 속한다(11). 그러나 이러한 항산화 체계는 체내에서 발생하는 산화적 손상을 완전히 예방 또는 복수하는데 충분하지 않기 때문에(12), 식품에 존재하거나 식품을 통해 섭취되는 항산화 물질들은 체내 산화적 손상을 낮추어 주는 데 도움이 되는 것으로 알려져 있다(13,14). 천연식물들을 직접 생약으로 이용하기보다는 식물 중에 함유된 생리활성작용을 나타내는 물질의 분리·동정하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있고, 더 나아가 고부가가치의 물질로 개발되어 사용되고 있다. 특히 최근 인공 합성 항산화제가 인체에 미치는 유해한 효과들이 보고(15) 되는 등 안정성 문제로 사용규제가 엄격해지면서 무해한 천연항산화제 연구에 대한 관심이 증대되고 있다(16,17)

한편 최근 우리나라에서도 고지혈증, 동맥경화증, 뇌혈관질환, 심장병과 같은 심혈관계 질환으로 인한 사망이 증가하고 있다(18). 혈관계 질환의 주요 원인은 음식물로 통하여 들어오는 지질 중 콜레스테롤과 저밀도 지단백(low density

lipoprotein, LDL)이 microphage에서 생성되는 활성산소, 유리기 그리고 내피세포의 lipoxygenase, 과산화지질에 의하여 쉽게 산화되어 산화 LDL로 된다. 이렇게 산화된 LDL은 내피세포에 축적되어 거대 거품세포(foma cell)를 형성하며, 이 과정에서 일부세포는 사멸되고 이 거대 거품세포가 증가하면서 지방층이 동맥벽에 쌓여 동맥경화가 일어나게 된다. 고지혈증(hyperlipidemia)은 혈장내에 콜레스테롤이나 중성지방이 비정상적으로 증가된 상태이며, 그 중 고콜레스테롤혈증 (hypercholesterolemia)은 죽상동맥경화증(atherosclerosis)과 고중성지방혈증(hypertriglyceridemia)을 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히 죽상동맥경화증은 혈류속도를 감소시켜 허혈성 심장질환, 협심증, 심근경색의 원인이 되므로 임상적으로 중요한 문제가 되고 있다(19) 이러한 고콜레스테롤 혈증은 체내 콜레스테롤의 생성과 소모의 불균형에 기인하는 것이다. 그러나 콜레스테롤은 동물 세포막에 존재하면서 세포막의 유동성과 물질 투과성을 조절하는 물질이며 steroid 호르몬, 비타민 D, 그리고 담즙산과 같은 생리적으로 중요한 물질의 전구체지만 혈액내의 cholesterol 함량이 과다하면 atherosclerotic plaque를 형성하여 각종 질환을 유발할 위험성이 있으므로 혈액내에서의 콜레스테롤의 안전한 이동과 혈액으로부터의 적절한 제거가 조절되어야 한다. 최근에 혈청 지질의 농도를 낮추기 위하여 천연물을 이용한 식이요법이나, 한방, 민간요법을 근거로 하여 혈중 LDL cholesterol 함량을 낮춤으로써 심혈관계질환으로 이환될 위험을 저하시킬 뿐 만 아니라 동맥경화증의 예방이나 치료를 가능하게 할 수 있는 많은 연구가 진행되고 있다(20-23).

느릅나무과(Ulmaceae)에 속하는 느릅나무(*Ulmus dividiana var. japonica*)는 느티나무와 닮았으며, 껍질을 유피, 뿌리의 껍질을 유근피라 한다. 낙엽성 활엽 교목으로 높이 30m에 달하며 잎은 광란형 또는 타원형으로 밑은 썸기 모양이고 길이는 3 ~ 12cm 로서 끝은 뾰족하며 톱니가 있다. 꽃은 속집취상화로서

가지의 상단에 대황록색의 작은 꽃이 4-5월에 피며, 과실은 익과로서 편평한 막질이며 5-6월에 성숙한다. 대부분 우리나라의 중·북부 지역에 자생하며, 지리적으로는 일본, 사할린, 쿠릴열도, 중국북부, 동시베리아에 분포한다(24). 예로부터 수종, 임질, 유선염 등을 칠하는 소염제로 이용되어 왔으며(25), 수피의 항염증 작용(26)과 메탄올 추출물의 진통, 소염, 항균작용(27) 및 위암 및 대장암에 대한 항암작용(28,29) 이외 성분에 대한 연구로는 배(30)등이 느릅나무 수피에서 (+)-catechin과 (+)-catechin-7-O-xylopytanose, (+)-catechin-7-piofurnaose와 같은 (+)-catechin의 배당체 화합물 및 (+)-catechin의 이량체인 소량의 procyanidin B-3화합물로 구성되어 있음을 밝혀냈고, 이(31)등은 근피에서 lyoniside, 5'-methoxyisolariciresinol-9'-O-β-D-ylopyranoaside, isolariciresinol-9'-O-β-D-ylopyranoaside, rel-trans-dihydrodehydroconiferyl alcohol 4'-O-arhamnoside, icariside E3 등의 6개의 lignan 및 neolignan을 분리 하였다. 느릅나무 활성에 관한 연구로는 느릅나무 수피 추출물의 약리학적 연구(32), triterpenoid계 성분인 firedelin, epifriedlanol 및 tataxerol에 의한 진통 작용(33), 느릅나무의 부탄올 추출분획의 항암제와의 병용투여에 의한 상승효과(34), mansonone F에 의한 항산화 작용 및 methicillin 내성 균주(MRSA)에 대한 항균작용(35), 준(36) 등 및 이(37) 등은 느릅나무 아질산염소거능과 권(38)등의 왕느릅나무로부터 분리한 flavonol 및 flavanone등에서 우수한 항산화 활성을 보고하였다.

최근에 한방이나 민간요법에 근거한 성인병 예방 및 치료효과에 대한 관심이 증대되어 천연 기능성 식품에 대한 수요가 증가되고 있다. 그러나 천연 식품을 식품재료화하여 기능성 식품의 신소재로 개발하기 위해서는 과학적이며 체계적인 식품학적인 연구 및 생리활성실험이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 유근피의 여러 문헌의 생리학적 연구를 토대로 유근피가 항산화 및 지방대사에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

이를 위하여 유근피의 일반 및 영양성분분석, *in vitro*에서 지질의 자동 산화계에서 유도된 과산화 반응의 억제 효과와 자유기에 대한 scavenger로서의 효과, *in vivo*에서 Sprague-Dawley 종의 수컷 흰쥐를 대상으로 유근피 에탄올 추출물 및 에탄올을 6주간 투여한 후 에탄올에 의한 간의 산화적 세포손상에 작용하는 oxygen free radical 소거효과를 알아보기 위해 체중증가율, 식이 효율과 혈청중의 glutamic pyruvic transaminase와 glutamic oxaloacetic transaminase를 측정하고 간 손상 억제 효과를 확인하기 위하여 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD), xanthine oxidase(XO), catalase, glutathione peroxidase등의 활성과 지질과산화물인 thiobarbituric acid reactant(TBARS) 및 glutathione의 함량을 측정하여 상호비교 관찰하였다. 고지혈증에 미치는 영향을 위해 *in vitro*에서 LDL 산화억제 작용을 측정하고, *in vivo*에서 혈청과 간에서 중성지방, 총콜레스테롤 및 인지질의 함량을 측정하여 유근피가 흰쥐의 지방대사에 미치는 영향을 검토코자 하였다.

## 제2장 재료 및 방법

### 제1절 실험재료

2003년 유근피는 한약재료상에서 건조된 국산을 구입하여 사용하였다.

### 제2절 성분분석

#### 1. 일반성분

A.O.A.C.(Association of Official Analytical Chemists)방법(39)에 준하여 수분은 105 °C 상압가열건조법, 조단백질은 micro-kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법 및 회분은 회화법으로 분석하였고, 탄수화물은 100에서 수분, 조단백질, 조지방 및 회분량을 감하여 나타냈으며 측정치는 3회 반복하여 측정한 수치의 평균값으로 나타내었다.

#### 2. 유리당

시료 1 g에 80% 에탄올 50 mL를 가하여 heating mantle에서 75 °C로 5시간 가열한 다음 Whatman filter paper (No. 2)로 여과하고 여액을 rotary vacuum evaporator에서 감압·농축 후 10 mL로 정용하여 ion chromatography (DX-600, Dionex, USA)로 분석하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

*Table 1. Operating condition of ion chromatography for free sugars*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600(Dionex, USA)
Column	Carbo Pac <sup>TM</sup> - PA10 analytical
Gard	Carbo Pac <sup>TM</sup> - PA10
Eluent A	200 mM NaOH /L
Eluent B	18 mM NaOH /L
Flow rate	1.0 mL/min
Inj. volume	10 $\mu$ L
Detection	ED 50 intergrated amperometry

### 3. 아미노산

분해관에 시료 0.5 g과 6 N HCl 3 mL를 취하여 탈기하고 121 °C에서 24시간 가수분해한 다음 여액을 rotary vacuum evaporator로 감압농축하여 sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 10 mL로 정용하였다. 용액 1 mL를 취하고 membrane filter(0.2  $\mu$ M)로 여과한 다음 아미노산자동분석기(Biochrom 20, Phamaacia England)로 분석하였으며 분석조건은 Table 2와 같다.



*Table 2. Operating condition of amino acid autoanalyzer for amino acids*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	Biochrom 20, Phamaacia England
Buffer solution	sodium phosphate buffer(pH 7.0)
Reagent	ninhydrin
Inj. volume	20 $\mu$ L

#### 4. 지방산

A.O.A.C.방법(77)에 준하여 시료 5 g을 warming blender로 균질화한 후 클로로포름 10 mL와 메탄올 20 mL을 가하고 2분간 균질화 다음 클로로포름 10 mL을 가하여 30초간 분사시켰다. 여과 후 30분간 방치한 후 상층을 제거하고 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 가하여 탈수한 다음 rotary vacuum evaporator로 감압·농축하였다. 지방 100 mg을 톨루엔 5 mL에 용해하고  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ 으로 메틸화하여 gas chromatography(GC-10A, Shimadzu, Japan)로 분석하였으며 분석조건은 Table 3과 같다.

*Table 3. Operating condition of gas chromatography for fatty acids*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	GC-10A(Shimadzu, Japan)
Column	SP <sup>TM</sup> -2560 capillary column(100 mm length × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness)
Column temp	170 °C(5 min) to 250 °C(10 min) at 4 °C/ min
Injector temp.	230 °C
Detector temp	FID 270 °C
Inj, volume.(cm/min)	2 μL
Split ratio	1 : 50

## 5. 비타민 A 와 비타민 E

시료 0.5 g, 아스코르빈산 0.1 g 및 에탄올 5 mL를 취하여 80 °C에서 10분간 가열한 후 50% KOH용액 0.25 mL을 첨가하고 20분간 가열한 다음 증류수 24 mL와 5 mL 헥산을 가하여 1,150 ×g에서 20분간 원심분리 하였다. 상정액을 분리 후 40 mL 헥산을 가하고 원심분리 하여 상정액을 분리한 다음 증류수를 가해 10분간 방치 후 하층을 제거하였다. 이 과정을 3회 반복한 후 전용액을 합하여 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수하고 rotary vacuum evaporator로 헥산을 3 mL까지 감압 · 농축한 후 HPLC(LC-10AVP, Shimadzu, Japan)로 분석하였으며 분석 조건은 Table 4와 같다.

*Table 4. Operating condition of high performance liquid chromatography for vitamin A and E*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	LC-10AVP(Shinadzu, Japan)
Column	Shim-pack GLC-ODS(M)25 cm
Eluent	acetonitrile : isopropanol= 95 : 5
Flow rate	1 mL/min
Inj.volume	10 $\mu$ L
Detection	retinol : SPD-10A(UV-VIS Detector 254 nm) tocopherol : RF-10A(Spectrofluorometric Detector) EX(290), EM(330) nm

## 6. 유기산

시료 1 g에 증류수 50 mL를 가하여 80  $^{\circ}$ C 수조에서 4시간 가열한 다음 Whatman filter paper (No. 2)로 여과하고, 여액을 rotary vacuum evaporator로 감압·농축한 후 증류수로 10 mL로 정용하여 ion chromatography(DX-600, Dionex, USA)로 분석하였으며 분석조건은 Table 5와 같다.

*Table 5. Operating condition of ion chromatography for organic acids*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600(Dioxen, USA)
Column	IonPac ICE-AS6 analytical
Eluent	0.4 mM heptafluorobutyric acid
Regenerant	5.0 mM tetrabutylammonium hydroxide
Flow rate	1.0 mL/min
Inj. volume	50 $\mu$ L
Detection	Surpressed conductivity, AMMS-ICE II

## 7. 무기질

시료 0.5 g, 20% 질산 10 mL 및 60% HClO<sub>4</sub> 3 mL를 취하여 투명해 질 때 까지 가열한 후 0.5 M 질산으로 50 mL로 정용하였다. 분석항목별 표준용액을 혼합 후 다른 vial에 8 mL씩 취하여 표준용액으로 하였고 0.5 M 질산을 대조구로 하여 원자흡수분광도계(AA-6501GS, Shimadzu, Japan)로 분석하였으며, 분석조건은 Table 6과 같다.

*Table 6. Operating condition of atomic absorption spectrophotometer for minerals*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>							
Instrument	AA-6501GS(Shimadzu, Japan)							
Lamp item	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Cu	Na	Zn
Wave length(nm)	422.7	248.3	766.5	285.2	279.5	324.8	330.2	213.9
Current(mA)	10	12	10	8	10	6	10	8
Slit width(nm)	0.5	0.2	0.5	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5
Lighting mode	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	Non-BGC	BGC-D2
Burner height(mm)	7	7	7	7	7	7	7	7
Fuel gas flow (mL /min)	2.0	2.2	2.0	1.8	2.0	1.8	1.8	2.0

## 8. 양 · 음이온

시료 5 g을 증발접시에 취하여 회화로에서 24시간 회화한 후 30분간 방냉시키고 HCl : 증류수 = 0.5 : 3.5인 용액 4 mL와 증류수 10 mL를 가하여 가온하면서 용해하였다. 상기 용액을 증류수로 100 mL로 정용하여 ion chromatography (DX-600, Dioxen, USA)로 분석하였으며 분석조건은 Table 7, 8과 같다.

*Table 7. Operating condition of ion chromatography for cations*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600(Dioxen, USA)
Column	IonPac AS14-4 mm analytical
Gard	IonPac AG14-4 mm
Eluent	3.5 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 1 mM NaHCO <sub>3</sub> / 1L
Flow rate	1.2 mL/ min
Inj. volume	10 µL
Detection	Supressed conductivity, ASRS-ultra 4-mm

*Table 8. Operating condition of ion chromatography for anions*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600(Dioxen, USA)
Column	IonPac CS-12A(4×250 mm)
Gard	IonPac CG-12A(4×50 mm)
Eluent	22 mN sulfuric acid/ 1 L
Flow rate	1.0 mL/ min
Inj. volume	20 µL
Detection	Supressed conductivity, CSRS-ultra 4-mm

### 제3절 항산화 효능 실험

#### 1. 시약

본 실험에 사용된 시약은 특급 및 일급 시약으로 xanthine oxidase, xanthine, cytochrome C, glutathione reductase, reduced glutathione(GSH), oxidized glutathione(GSSG) reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH), nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), glycine, sodium pyrophosphate, semicarbazide hydrochloride, sodium azide, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH),  $\alpha$ -1-antitrypsin, perchloric acid, sulfosalicylic acid(SSA), bovine serum albumin, potassium ferricyanide(KCN), ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), Tris-HCl, sucrose, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), sodium phosphate(monobasic, dibasic), phenol reagent,  $\text{NaNO}_2$ , DPPH, sulfanylic acid, naphthylamine, linoleic acid는 Sigma사(Sigma-Aldrich Co., USA), ethanol, n-hexane, chloroform, ethylacetate 및 n-butanol은 HPLC grade로 Tedia사(Tedia Co., USA), trichloroacetic acid(TCA)는 Aldrich사 및 유지(soybean oil)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 실험기기

- 가. Centrifuge : Eppendorf 5810R, Germany
- 나. Evaporator : Eyela, Rotary vacuum evaporator, Japan
- 다. Spectrophotometer : Shimadzu UV-1601PC, Kyoto, Japan
- 라. Deep freezer : MDF-U52V Sanyo, Japan
- 마. Ultra turax : IKA MT-25 Janke & Kunkel, Germany
- 바. Shaking water bath : JEIO-TEK SWBO3, Korea
- 사. Rancimat 679 : Metrohm Ltd. CH-9101 Herisau Switzerland
- 아. pH meter : Denver model 15, USA
- 자. Gas chromatography : GC-10A, Shimadzu, Japan
- 차. Amino acid autoanalyzer : Biochrom 20, Phamacia, UK
- 카. Ion chromatography : DX-600, Dionex, USA
- 타. High perfomance liquid chromatography : LC-10AVP, Shimadzu, Japan
- 파. Ion chromatography : DX-600, Dionex, USA
- 하. Atomic absorption spectrophotometer : AA-6501GS, Shimadzu, Japan
- 가. Electrophoresis power supply : EPS 301, USA

## 3. 시료추출

### 가. 에탄올 추출

유근피 100 g과 80% 에탄올 500 mL를 혼합하여 blender(Braun. MR 350 CA)로 조분쇄하고 65 °C에서 환류냉각기를 부착하여 3시간씩 3회 추출한 후 Whatman filter paper(No. 2)로 여과하였다. 여액을 40 °C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator로 용매를 제거하고 감압·농축한 후 -70 °C에 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

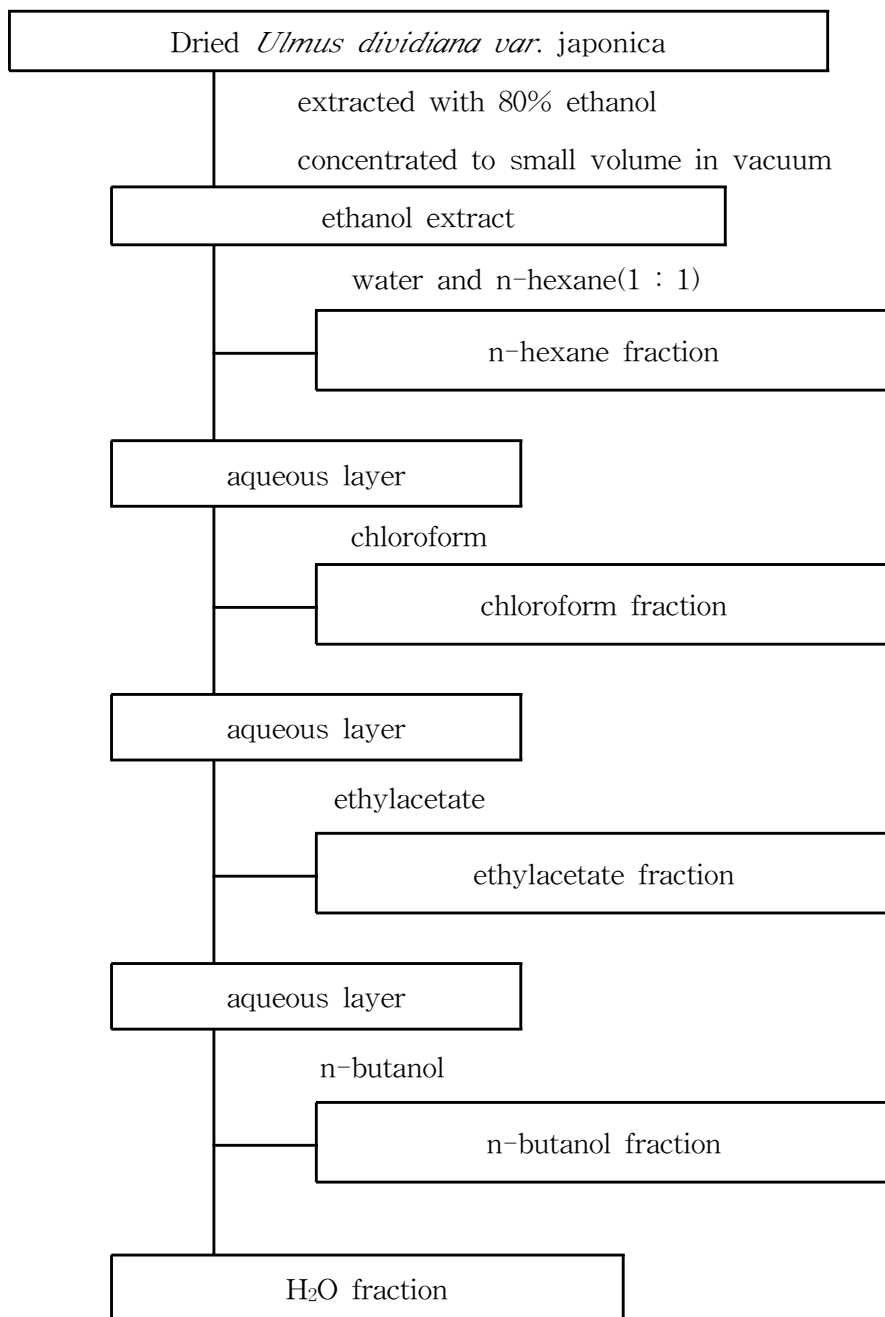


## 나. 다용매 분획 추출

유근피 에탄올 추출물을 Fig. 1과 같이 separating funnel에 의한 용매별 분획으로 n-hexane, chloroform, ethylacetate 및 n-butanol로 연속 추출(40)하였으며, Table 9와 같이 각 분획물은 항산화활성 측정용 시료로 하였다.

*Table 9. Yield of Ethanol extract and its solvent fraction from dried Ulmus dividiana var. japonica*

Fraction	Yield(g)	Yield(%)
Ethanol ext.	16.10	-
n-Hexane	1.37	8.5
Chloroform	2.38	14.8
Ethylactate	0.69	4.3
n-Butanol	2.60	16.2
Water	1.80	11.25



*Fig. 1. Scheme for extraction and fractionation of antioxidants from *Ulmus dividiana* var. japonica*

#### 4. *In vitro* 에서 항산화활성

##### 가. *DPPH radical* 소거작용

시료의 전자공여능 측정은 Blois(41)의 방법에 준하여 유근피 에탄올 추출물 분획들과 합성항산화제인 BHT가 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 즉, 일정 농도의 시료 2 mL에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH용액(dissolved in 99% ethanol)을 1 mL가하고, vortex mixing하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 흡수분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 전자 공여능(electron donating ability)으로 측정하였으며, 각 분획의 억제강도는 대조군에 비해 DPPH free radical을 50% 억제 하는데 요구되는 농도(IC<sub>50</sub>)와 비교하였다. 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

##### 나. 항산화지수(*active oxygen method(AOM)- Rancimat* 측정)

각 분획에 포함된 용매를 완전히 제거한 후 각 분획의 농도가 600 ppm이 되도록 soybean oil(Sigma Co., USA)에 첨가하고, 초음파를 이용하여 시료 추출물과 유지가 잘 혼합되도록 하였다. Rancimat의 측정조건은 시료 3.0 g을 반응용기(reaction vessel)에 취하고 증류수 70 mL을 측정용기(measuring vessel)에 넣은 후 110°C에서 air flow rate 20 L/hr로 하여 산화안정성을 비교하였다(42). 항산화지수(antioxidant index, AI)는 분획을 첨가한 실험구의 유도시간을 분획을 첨가하지 않은 대조구의 유도시간으로 나눈 값을 구하였고, 모든 측정치는 3회 반복 시험하여 얻은 값의 평균치로 표시하였다. 기존의 상업용 항산화제인 BHT를 유지에 대해 첨가하여 비교 실험하였다.

#### 다. 아질산염 소거 작용(*nitrite scavenging ability, NSA*)

Kato 등(43)의 방법에 준하여 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 1 mL에 분획 0.02 mL를 가하고 0.1 N 염산(pH 1.2), 0.2 M 구연산 완충용액(pH 4.2, pH 6.0)으로 각각 pH를 보정한 다음 반응액의 부피를 10 mL로 정용하였다. 용액을 37 °C에서 1 시간 반응시킨 후 1 mL 씩 취하고 2% 초산 5 mL와 30% 초산에 용해한 Griess 시약(1% sulfanylic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 mL를 가하여 15분간 방치한 다음 spectrophotometer 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 증류수를 가하여 상기와 동일한 방법으로 측정하였으며, 아질산염 소거능은 분획을 첨가하기 전과 후의 아질산염 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{아질산염 소거율(\%)} = 1 - \frac{(A-C)}{B} \times 100$$

A : 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 분획을 첨가하여 1시간 방치시킨 후의 흡광도

B : NaNO<sub>2</sub> 용액의 흡광도

C : 분획자체의 흡광도

#### 라. *Linoleic acid*에 대한 항산화 작용

삼각플라스크에 linoleic acid 1 mL, 에탄올 20 mL, 분획 0.1 mL 및 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 25 mL를 취하여 50 °C에서 일정 기간동안(3, 5, 7일) 저장한 후 반응액을 분획여두에 옮겨 클로로포름을 가하고 3회 반복 추출하였다. 클로로포름추출액에 초산 25 mL 및 포화 KI 용액 1 mL를 가하고 암소에 5분간 방치한 다음 증류수 50 mL를 가한 후 가용성 전분을 지시약으로 하여 0.01N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>용액으로 적정하였다(44).

## 마. 지질과산화물 생성 억제 작용(TBARS)

기질용액은 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol을 4 : 1로 혼합한 용매에 linoleic acid(Sigma Co., USA)를 0.03 M 이 되도록 첨가하였다. 이 기질 용액(2 mL)에 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) 19.2 mL와 각 분획별 시료 0.8 mL를 첨가한 후 40℃ 항온기에서 진탕하면서 경시적으로 혼합액 2.0 mL을 취하여 분석하였다. 위 혼합액 2.0 mL에 35% TCA 1.0 mL와 0.75% TBA 2.0 mL를 가한 다음 30초 동안 진탕 시켜 95℃ 수욕상에서 40분 동안 반응 시켰다. 이 반응액을 실온에서 냉각시켜 acetic acid 10. mL와 chloroform 2.0 mL을 가하여 진탕 시킨 후, 4,500 xg에서 5분 동안 원심분리 하여 상징액의 흡광도를 6일 동안 1일후, 4일 후, 6일후에 spectrophotometer 532 nm에서 측정하여 이를 TBA 값으로 하였다(45)

## 5. *In vivo* 에서 항산화효능

### 가. 실험동물

조선대학교 실험동물센터에서 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 공급받아 실험전 1주일간 고형 배합사료(삼양사료)와 물로 적응시킨 후, 체중 80 ~ 100 g 인 것을 난괴법(randomized complete block design)에 의하여 Table 10과 같이 각 군당 10마리씩 5군으로 분류하였다. 즉, 정상군(NOR), 35% ethanol 10 mL/kg of body weight(b.w.)/day(이하 알코올)투여 군(CON), 유근피 에탄올추출물 200 mg/kg of b.w./day 투여 군(UD-1), 유근피 에탄올추출물 200 mg/kg of b.w./day 투여 군(UD-2), 유근피 에탄올추출물 200 mg/kg of b.w./day 및 알코올 병합투여군(UDE1), 유근피 에탄올추출물 400 mg/kg of b.w./day 및 알코올 병합투여군(UDE2)을 상자(cage)에 1마리씩 넣어 6주 동안 사육하였다.

## 나. 에탄올추출물 및 알코올 투여

유근피 에탄올추출물은 예비 실험을 토대로 체중 kg 당 200 mg 과 400 mg 이 함유되도록 생리식염수에 조제한 시료 1 mL, 알코올은 Fujji 등(46)의 방법에 준하여 조제된 알코올 1 mL 및 정상군은 동일한 양의 생리식염수를 magen sonde를 이용하여 6주간 경구 투여하였다.

## 다. 체중 및 식이섭취량

실험기간 중 동물의 상태를 관찰하면서 체중은 1주일 간격으로, 식이섭취량은 2일 간격으로 측정하였고 사육기간의 체중증가량을 동일 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율(feed efficiency ratio, FER)을 구하였다.

## 라. 실험동물 처치

처치 전 16시간 동안 절식시킨 후 CO<sub>2</sub>로 가볍게 마취한 다음 개복하여 복부 대동맥에서 채혈하여 실온에서 1시간이상 방치 후 4,500 xg에서 20분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 혈청 AST, ALT, ALP함량을 측정 하였으며, 간을 적출 하여 0.9% 생리식염수로 남아 있는 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 여지로 수분을 제거한 후 -70℃의 deep freezer에 보관하면서 효소 활성 측정에 사용하였다.

**Table 10. Composition of experimental diet and groups**

<b>Groups</b>	<b>Diet composition</b>
NOR	Basal diet <sup>1)</sup>
CON	Basal diet + EtOH <sup>2)</sup>
UD-1	Basal diet + UDL <sup>3)</sup>
UD-2	Basal diet + UDH <sup>4)</sup>
UDE1	Basal diet + EtOH + UDL
UDE2	Basal diet + EtOH + UDH

<sup>1)</sup> According to AIN-93 diet composition : Casein 200.0, L-methionine 3.0, Beef tallow 100.0, Choline chloride 2.0, Corn starch 448.0, Sucrose 150.0, Cellulose 50.0, Cholic acid 2.0, Mineral Mix 35, Vitamin Mix10

Mineral Mix(AIN-93-MX)(g/kg mixture): Potassium phosphate monobasic(22.76% P, 28.73% K) 250.00, Potassium citrate, Tripotassium monohydrate(36.16% K) 28.00, Sodium sulfate(39.34%, 60.66% Cl) 74.00, Potassium sulfate(44.87%, 18.39% S) 46.60, Magnesium oxide(60.32% Mg) 24.00, Ferric citrate(16.5% Fe) 6.06, Zinc citrate(52.14% Zn) 1.65, Sodium meta-silicate H<sub>2</sub>O(9.88% Si) 1.45, Manganese carbonate(44.79% Mn) 0.63, Cupric carbonate(57.47% Cu) 0.30, Chromium potassium sulfate 2H<sub>2</sub>O(10.42% Cr) 0.275, Boric acid(17.5% B) 0.0815, Sodium fluoride (42.25% F) 0.0635, Nickel carbonate(45% Ni) 0.0318, Lithium chloride(16.83% Li) 0.0174, Sodium selenate anhydrous(41.79% Se) 0.01025, Potassium iodate(59.3% I) 0.010, Ammonium paramolybdate · H<sub>2</sub>O(54.34% Mo) 0.00795, Ammonium vanadate(43.55% V) 0.0066, Powdered sucrose 209.806

Vitamin Mix(AIN-93-VX)(g/kg mixture) : Nicotinic acid 3,000, Capantothenate 1,600, Pyridoxin-HCl 700, Thiamin-HCl600, Riboflavin 600, Folic acid 200, Biotin 20, Vitamin B<sub>12</sub>(cyanocobalamin)(0.1% in manitol) 2,500, Vitamin E(all-rac-tocopheryl acetate)(500 IU/g) 15,000, Vitamin D<sub>3</sub>(cholecalciferol)(400,000 IU/g) 800, Vitamin K(phyloquinone) 75, Powdered sucrose 974.665

<sup>2)</sup> EtOH : 35 % ethanol 10 mL/kg of b.w./day

<sup>3)</sup> UDL : *Ulmus davidian var. japonica* ethanol extract 200 mg/kg of b.w./day

<sup>4)</sup> UDH : *Ulmus davidian var. japonica* ethanol extract 400 mg/kg of b.w./day

## 마. 효소활성

### (1) 효소원 조제

간 조직 1 g당 4배량의 0.25 M sucrose buffer(pH 7.5)를 가하고 병냉하에서 ultra turax homogenizer(Janke & Kunkel, Germany)로 10,000 ×g에서 2분간 마쇄하였다. 마쇄액의 일부는 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량 측정에 사용하였고, 나머지는 4 °C, 600 ×g 에서 10분간 원심분리 하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 상정액을 15,000 ×g에서 20분간 원심분리 하여 얻은 상정액은 xanthine oxidase(XO), superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성측정의 효소원 및 단백질함량 측정에 사용하였다. 또한 간 조직 0.1 g에 5%(W/V) sulfosalicylic acid(SSA) 2 mL를 가하고 마쇄 후 10,000 ×g에서 10분간 원심분리 하여 상정액을 glutathione(GSH) 함량 측정에 사용하였다.

### (2) XO 활성

Downey(47)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 50 mM phosphate buffer(pH 7.8) 2.8 mL에 10 mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA) 0.03 mL, 5 mM xanthine 0.03 mL을 가하여 혼합한 다음 25 °C에서 3분간 방치하고 효소원 0.1 mL를 가하여 290 nm에서 3분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 요산의 흡광계수를  $10.03 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  로 간주해 계산하였으며, 효소량 mU/g protein을 1unit로 표시하였다.



### (3) SOD 활성

Crapo 등(48)의 방법에 의하여 xanthine, xanthine oxidase 및 cytochrome C 를 이용하여 측정하였다. 즉 시험관에 100 mM phosphate buffer (pH 7.8) 2.3 mL에 0.5 mM xanthine 0.3 mL와 0.1 mM cytochrome C 0.3 mL를 가하고 혼합하여 흡광도의 증가 속도가 매분 당 0.02이 되도록 xanthine oxidase용액을 첨가한 후 550 nm에서 1분간 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 상기 조건에서 효소원을 가하여 증가되는 흡광도를 측정하였고, cytochrome C 환원 속도를 50% 억제하는 효소량  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein을 1 unit로 표시하였다

### (4) Catalase 활성

Aebi(49)의 방법에 의하여 소모되는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 양으로 측정하였다. 즉, 25 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 포함한 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 3.0 mL에 효소원 10  $\mu\text{L}$ 를 가하여 혼합한 후 240 nm에서 60초간 변화되는 흡광도를 측정하였으며, 효소의 활성도는 1분 동안에 1 mM의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 분해시키는 효소량 decreased  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein을 1 unit로 표시하였다.

### (5) GSH-Px 활성

Flohe등(50)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉 10 mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.5 mL에 3 mM GSH, 20 mM  $\text{NaN}_3$ , glutathione reductase 0.72 U, NADPH 0.45 mM 과 효소원을 넣고 0.45 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 가하여 340 nm에서 3분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 비효소적 반응은 상기와 같은 조건에서 단지 0.45 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  를 가하지 않고 흡광도의 변화를 측정하였으며, 효소 활성은 비효소적 반응에 의한 흡광도 변화를 제한 값으로 하여 다음 식에 의해서 계산하여 효소량 decreased NADPH  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein을 1 unit로 표시하였다.

$$A = 0.868( [NADPH] / [GSH]_0 t)(V_i / V_s)$$

A : 효소활성도

[NADPH] : NADPH농도변화

[GSH]<sub>0</sub> : GSH의 처음농도

t : 반응시간

V<sub>i</sub> : 반응액 용량

V<sub>s</sub> : 효소액 용량

#### (6) TBARS함량

TBARS함량은 Buege와 Aust의 방법(51)에 의하여 측정하였다. 즉 TBA 시약(0.375% TBA in 0.25 N HCl) 1.0 mL에 BHT를 최종농도가 0.01%가 되게 가하고 균질액 1.0 mL를 가하여 잘 혼합한 후 98 °C로 15분간 가열하였다. 즉시 냉각시켜 1,500 ×g로 15분간 원심분리하고 535 nm에서 상정액의 흡광도를 측정하였다. Malondialdehyde의 흡광계수  $1.56 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 계산하였다.

#### (7) GSH 함량

GSH함량은 Tietze의 방법(52)으로 측정하였다. 즉 시험관에 working buffer 700 μL, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 100 μL, 시료액 20 μL 및 증류수180 μL를 가하여 30 °C에서 3분간 방치한 후 GSSG 5 μL를 첨가하고 412 nm에서 1분동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. GSH함량은 GSH표준액 1 μM, 2 μM, 3 μM 및 4 μM을 상기와 같은 방법으로 측정하여 계산하였다.

## (8) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법(53)에 의하여 bovine serum albumin (Sigma Fr. V)을 표준물질로 하여 측정하였다.

### 바. 혈청 중의 *AST*, *ALT*, *ALP* 활성

Aminotransferase 활성은 Reitman과 Frankel(54)의 방법에 의하여 조제된 혈청 transaminase 측정용 kit(신양화학)를 사용하여 alanine aminotransferase(ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST) 활성을 측정하고 단위는 혈청 mL당 karmen unit로 표시하였다. Alkaline phosphatase 활성은 조제된 kit 시약(영동제약)을 사용하여 측정하였고 king armstrong unit로 표시하였다.

### 사. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 10.1(Statistical package for the social science)P/C package를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)를 실시하였으며, 사후검정은 Tukey(T)-test에 의하여 실행하였다. 본 연구에 이용된 통계적 유의성 검증은  $\alpha < 0.05$  수준에서 이루어 졌다.

## 제4절 고지혈증 억제효능 실험

### 1. *In vitro* 에서 고지혈증 억제 효과 측정

#### 가. LDL의 분리

유근피 추출물의 용량별 LDL 산화억제 효과는 사람의 혈장에서 LDL을 분리하여 측정하였다. LDL( $1.019 < d < 1.063$ )은 건강한 사람의 혈액을 4°C에서 3시간 방치 후 450 ×g, 4°C에서 20분간 원심분리 하여 상층부의 혈장을 취한 다음, gentamycin sulfate 1 mg/25 mL을 첨가하여 46,000 ×g에서 24시간 원심분리하여 얻었다. 이를 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01M phosphate buffer(pH7.4)에서 20시간 투석하여 LDL을 분리하여 냉동 건조하여 사용하였다 (55).

#### 나. LDL 산화 억제 효과

LDL의 산화 유발을 위해 65 µg LDL/mL, 16 µM CuSO<sub>4</sub>에 전체 부피가 1 mL가 되도록 phosphate buffer(pH7.4)를 섞은 뒤, 37°C에서 2시간 동안 배양한 뒤 EDTA(1mM)를 20 µL를 첨가하여 산화를 중지 시켰다. LDL내의 산화지질량(MDA의 양)은 TBARS 방법으로 측정하였다. 각 분획 30 µg/mL에서 2시간 후 TBARS 함량 변화를 측정하여 LDL 산화에 미치는 유근피 분획의 항산화 효과를 실험하였다. EDTA 첨가로 산화가 중지된 LDL용액에 TCA-TBA-HCl 정지액(15% trichloroacetic acid; 0.375% thiobarbituric acid; 0.25N HCl) 3 mL를 가한 후, 95°C에서 30분간 중탕한다. 냉각시킨 뒤 4,500 xg에서 10분간 원심분리 시킨 후 상등액을 취하여 생성된 MDA 함량을 532 nm에서 측정하였다 (56).

## 2. *In vivo* 에서 고지혈증 억제효능 실험

### 가. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 Sprague Dawley계 5주령 음성 흰쥐 50마리를 조선대학교 실험동물센터에서 1주일 동안 기본식으로 적응시킨 후 평균 체중 80~100 g인 것을 난피법에 따라 Table 11과 같이 식이 하였고 Table 12와 같이 실험하였다. 즉, 정상군(NOR), 고콜레스테롤 식이 급여군(대조군, CON), 유근피 에탄올 추출물 200 mg/kg of b.w./day투여군(이하 UD-1이라 함), 유근피 에탄올 추출물 400 mg/kg of b.w./day투여군(이하 UD-2이라 함), 유근피 에탄올 추출물 200 mg/kg of b.w./day 및 고콜레스테롤 식이 병합투여군(UDC1), 유근피 에탄올 추출물 400 mg/kg of b.w./day 및 고콜레스테롤 식이 병합투여군(UDC2)으로 구분하여 6주 동안 상자(cage)에 1마리씩 사육하였다. 고콜레스테롤혈증 유발식은 AIN-93을 기준으로 1% 콜레스테롤과 0.25% 콜산나트륨을 첨가하여 조제하였다. 물과 식이는 제한 없이 공급하였고 사육실 온도는 18±2 °C로 유지하였으며 조명은 12시간 주기(08:00~20:00)로 조절하였다. 최종 체중에서 실험개시 전의 체중을 감하여 실험개시 전의 체중으로 나누어 체중증가율로 표시하였고, 사육기간의 체중증가량을 동일 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율(F.E.R.)을 구하였다.

**Table 11. Composition of experimental diet containing cholesterol**

(g/kg)

<i>Diet composition</i>	<i>Basal diet</i>	<i>High-cholesterol diet</i>
Casein	200.0	200.0
L-methionine	3.0	3.0
Beef tallow	100.0	100.0
Choline chloride	2.0	2.0
Corn starch	448.0	443.0
Sucrose	150.0	150.0
Cellulose	50.0	50.0
Cholic acid	2.0	2.0
Vitamin mixture(AIN 93) <sup>1)</sup>	10.0	10.0
Mineral mixture (AIN 93) <sup>2)</sup>	35.0	35.0
Cholesterol	0.0	5.0

1) Mineral Mix(AIN-93-MX)(g/kg mixture): Potassium phosphate monobasic(22.76% P, 28.73% K) 250.00, Potassium citrate, Tripotassium monohydrate(36.16% K) 28.00, Sodium sulfate(39.34%, 60.66% Cl) 74.00, Potassium sulfate(44.87%, 18.39% S) 46.60, Magnesium oxide(60.32% Mg) 24.00, Ferric citrate(16.5% Fe) 6.06, Zinc citrate(52.14% Zn) 1.65, Sodium meta-silicate H<sub>2</sub>O(9.88% Si) 1.45, Manganese carbonate(44.79% Mn) 0.63, Cupric carbonate(57.47% Cu) 0.30, Chromium potassium sulfate 2H<sub>2</sub>O(10.42% Cr) 0.275, Boric acid(17.5% B) 0.0815, Sodium fluoride (42.25% F) 0.0635, Nickel carbonate(45% Ni) 0.0318, Lithium chloride(16.83% Li) 0.0174, Sodium selenate anhydrous(41.79% Se) 0.01025, Potassium iodate(59.3% I) 0.010, Ammonium paramolybdate · H<sub>2</sub>O(54.34% Mo) 0.00795, Ammonium vanadate(43.55% V) 0.0066, Powdered sucrose 209.806

2) Vitamin Mix(AIN-93-VX)(g/kg mixture) : Nicotinic acid 3,000, Capantothenate 1,600, Pyridoxin-HCl 700, Thiamin-HCl600, Riboflavin 600, Folic acid 200, Biotin 20, Vitamin B<sub>12</sub>(cyanocobalamin)(0.1% in manitol) 2,500, Vitamin E(all-rac-tocopheryl acetate)(500 IU/g) 15,000, Vitamin D<sub>3</sub>(cholecalciferol)(400,000 IU/g) 800, Vitamin K(phyloquinone) 75, Powdered sucrose 974.665

*Table 12. Composition of experimental groups*

<i>Groups</i>	<i>Composition</i>
NOR	Basal diet
CON	High-cholesterol
UD1	Basal diet + UDL <sup>1)</sup>
UD2	Basal diet + UDH <sup>2)</sup>
UDC1	High-cholesterol + UDL <sup>1)</sup>
UDC2	High-cholesterol + UDH <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> UDL : *Ulmus davidian* var. japonica ethanol extract 200 mg/kg of b.w./day

<sup>2)</sup> UDH : *Ulmus davidian* var. japonica ethanol extract 400 mg/kg of b.w./day

#### 나. 실험동물의 처리

흰쥐를 16시간 절식시킨 후 에테르로 마취하고 개복한 다음 복부대동맥에서 채혈하여 실온에서 30분간 방치하였다. 1,150 ×g에서 10분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 혈청지질측정용 시료로 하였다.

#### 다. 혈청 중 효소활성

Aminotransferase 활성은 Reitman과 Frankel(54)의 방법에 의하여 조제된 혈청 transaminase 측정용 kit(신양화학)를 사용하여 ALT 및 AST 활성을 측정하고 단위는 혈청 mL당 karmen unit로 표시하였다. ALP활성은 조제된 kit 시약(영동제약)을 사용하여 측정하였고 king armstrong unit로 표시하였다.

## 라. 혈청 중 지질함량

혈청 중 중성지질함량은 McGowan 등의 방법(57)에 준하여 조제된 kit(AM157S-K, Asan), 총콜레스테롤함량은 Richmond의 효소법(58)에 준하여 조제된 kit(AM202-K, Asan), 인지질 함량은 Eng와 Noble(59)의 방법으로 조제된 kit(Wako Co., Japan) 및 유리콜레스테롤 (G-HH54, Shinyang)을 사용하여 측정하였다. HDL-콜레스테롤함량은 Noma 등의 효소법(60)에 준하여 조제된 kit(AM203-K, Asan), LDL-콜레스테롤함량은 Friedwald식 {총콜레스테롤-(HDL-콜레스테롤+중성지질/5)}에(61) 의하여 계산하였다. HDL-콜레스테롤의 총콜레스테롤에 대한 비율은 총콜레스테롤을 HDL-콜레스테롤로 나누어 계산하였으며, 콜레스테릴 에스테르함량은 총콜레스테롤함량에서 유리콜레스테롤함량을 감하여 구하였다. 심혈관계질환의 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수 (atherogenic index, AI)는(62) {(총콜레스테롤- HDL-콜레스테롤)/ HDL-콜레스테롤}에 의하여 구하였다.

## 마. 간장 중 지질함량

간장 및 지방조직(부고환지방 및 내장지방)의 총지질 함량은 Folch법(63)에 준하여 실시하였는데, 적출한 0.5 g 정도의 간과 지방조직에  $\text{CHCl}_3$ -MeOH(2 : 1, v/v)과  $\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여 vortex시킨 다음 4,500 xg에서 20분간 원심분리하여 지질을 추출한 다음 총지질 함량을 계산하였다. 추출한 지질을 이용하여 총콜레스테롤 함량 분석은 Zlatkis와 Zak(64)방법에 의하여 550 nm에서 측정하였고, 중성지방 함량 분석은 Biggs 등(65)의 방법으로 410 nm에서 측정하였다.



## 제3장 결과 및 고찰

### 제1절 성분분석

#### 1. 일반성분

건조한 유근피의 일반성분 함량은 Table 13과 같이 수분 7.5%, 조단백 4.46%, 조지방 0.5%, 조회분 10.02% 및 탄수화물 77.34% 이었다. 이등(66)이 연구한 결과와 비교해 보면 수분 6.5%, 조회분 10.3%, 조단백 4.5%, 조지방 0.4%로 비슷한 함량을 나타내었다.

Table 13. Proximate compositions of *U. davidian var. japonica*

(%)

<i>Items</i>	<i>Contents</i>
Moisture	7.5
Crude protein	4.46
Crude fat	0.5
Crud ash	10.2
Carbohydrate	77.34

## 2. 유리당

유리당 함량을 분석한 결과는 Table 14와 같다. Fructose 함량이 가장 많았으며, 다음으로 maltose, arabinose 순이었다.

*Table 14. Contents of free sugars in U. davidian var. japonica*

(mg%)

<i>Free sugar</i>	<i>Content</i>
D-Arabinose	0.004
D-Glucose	0.003
D-Fructose	0.042
D-Maltose	0.005

## 3. 구성아미노산 조성

주요 구성 아미노산은 Table 15와 같다. 총 아미노산은 모두 16종이 검출 되었다. 총 아미노산 함량은 2,799.87 mg%로 aspartic acid 함량이 가장 많았으며, phenylalanine, glutamic acid 및 isoleucine 순이었다. 필수아미노산의 경우 phenylalanine, isoleucine, leucine, threonine, tyrosine, lysine, histidine, methionine, valine 순이었으며, 총 아미노산에 대한 필수아미노산의 비율은 38.07%였다.

*Table 15. Contents of total amino acids in U. davidian var. japonica*  
(mg%)

<i>Amino acid</i>	<i>Content</i>
Aspartic acid	459.33
Threonine	156.03
Serine	84.36
Glutamic acid	298.10
Proline	200.62
Glycine	168.93
Alanine	103.27
Valine	14.37
Methionine	21.57
Isoleucine	265.74
Leucine	162.36
Tyrosine	153.27
Phenylalanine	321.35
Histidine	124.66
Lysine	130.64
Arginine	135.27
Total A.A.	2,799.87
Total E.A.A.	1066.249
E.A.A. %	38.07%

#### 4. 지방산 조성

주요 지방산을 분석한 결과는 Table 16과 같다. 포화지방산은 palmitic acid(C<sub>16:0</sub>)가 가장 많았으며, 불포화지방산은 linoleic acid(C<sub>18:2</sub>), linolenic acid(C<sub>18:3</sub>), oleic acid(C<sub>18:1</sub>) 순으로 나타났는데, 특히 전지방산 중에서 linoleic acid(C<sub>18:2</sub>)함량이 가장 높았으며, polyunsaturated fatty acid/saturated fatty acid는 2.517이었다.

**Table 16. Composition of fatty acids of *U. davuidian var. japonica***

<b>Fatty acid</b>	<b>Composition (%)</b>
Butyric Acid Methyl Ester(C4:0)	0.00
Caproic Acid Methyl Ester(C6:0)	2.74
Capric acid (C10:0)	0.00
Undecanoic acid (C11:0)	0.00
Lauric acid (C12:0)	0.00
Tridecanoic acid (C13:0)	0.00
Myristic acid (C14:0)	0.00
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.00
Palmitic acid (C16:0)	21.05
Heptadecanoic acid (C17:0)	0.00
Stearic acid (C18:0)	2.07
Arachidic acid (C20:0)	0.00
Heneicosanoic acid (C21:0)	1.92
Behenic acid (C22:0)	0.00
Tricosanoic acid (C23:0)	0.00
<b>Lignoceric acid (C24:0)</b>	<b>0.00</b>
Saturates	25.24
Myristoleic acid (C14:1)	0.00
cis-10-Pentadecenoic acid (C15:1)	2.40
Palmitoleic acid (C16:1)	0.00
cis-10-Heptadecenoic acid (C17:1)	0.00
Elaidic acid (C18:1n9t)	0.00
Oleic acid (C18:1n9c)	8.79
cis-11-Eicosenoic acid (C20:1)	0.00
Erucic acid (C22:1n9)	0.00
<b>Nervonic acid (C24:1)</b>	<b>0.00</b>
Monoenes	11.19
Linolelaidic acid (C18:2n6t)	0.00
Linoleic acid (C18:2n6c)	52.49
cis-11,14-Eicosadienoic acid (C20:2)	0.00
cis-13,16-Docosadienoic acid (C22:2)	0.00
r-Linolenic acid (C18:3n6)	0.00
Linolenic acid (C18:3n3)	11.10
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid(C20:3n6)	0.00
cis-11,14-Eicosatienoic acid (C20:3n3)	0.00
Arachidonic acid (C20:4n6)	0.00
EPA (C20:5n3)	0.00
<b>DHA (C22:6n3)</b>	<b>0.00</b>
<b>Polyenes</b>	<b>63.57</b>
Total	100.00
Polyunsaturated fatty acid/saturated fatty acid	2.52

## 5. 비타민 A 및 E

비타민 A와 E의 함량은 Table 17과 같다. 비타민 A 와 E 의 함량은 각각 0.0319 mg%, 0.0148 mg% 이었다.

*Table 17. Contents of vitamin A and E in U. davidian var. japonica*

(mg%)

<i>Vitamin</i>	<i>Content</i>
A	0.0319
E	0.0148

## 6. 유기산

유기산 함량은 Table 18과 같다. Formic acid 함량이 0.077 mg%로 가장 높았으며 다음으로 malic acid 0.050 mg%순이었고 furmaric acid 0.010 mg% 과 succinic acid 0.001 mg%가 검출 되었다.

*Table 18. Contents of organic acids in U. davidian var. japonica*

(mg%)

<i>Organic Acid</i>	<i>Content</i>
Malic acid	0.050
Formic acid	0.077
Furmaric acid	0.010
Succinic acid	0.001

## 7. 무기질

무기질 함량은 Table 19와 같다. Ca이 6753.5 mg%로 가장 많았으며, 다음으로 K 504.4 mg%, Mg 110.4 mg%, Fe 40.62 mg%순이었다. 그 외 미량의 Zn, Mn, Na, Cu등이 검출 되었으며, 항산화 효소에 포함된 미량 무기질 들 즉, Se, Mn, Cu, Zn의 식이 내 섭취 정도는 다른 항산화 영양소와 항산화 metalloenzyme의 농도와 활성에 직접적인 영향을 끼친다고 하여 이들 금속이 항산화 작용에 관여한다는 보고가 있다(67).

*Table 19. Contents of minerals in U. davidian var. japonica*

(mg%)

<i>Mineral</i>	<i>Content</i>
Ca	6753.50
Fe	40.62
K	504.40
Mg	110.40
Mn	1.19
Cu	0.62
Na	20.89
Zn	1.87

## 8. 양 · 음이온의

양 · 음이온의 함량은 Table 20, 21과 같다. 양이온은 calcium( $\text{Ca}^{2+}$ )의 함량이 45.15 mg%로 가장 많았으며. 다음으로 potassium( $\text{K}^+$ ) 순이었다. 음이온은 nitrate( $\text{NO}_3^-$ )이온, phosphate( $\text{PO}_4^{3-}$ )과 sulfate( $\text{SO}_4^{2-}$ )이온이 가장 높았으며 다음으로 fluoride( $\text{F}^-$ )이온 순이었다.

*Table 20. Contents of cations in U. davidian var. japonica*

(mg%)

<i>Cation</i>	<i>Content</i>
Lithium( $\text{Li}^+$ )	0.001
Sodium( $\text{Na}^+$ )	0.005
Ammonium( $\text{NH}_4^+$ )	0.001
Potassium( $\text{K}^+$ )	0.051
Magnesium( $\text{Mg}^{2+}$ )	0.001
Calcium( $\text{Ca}^{2+}$ )	0.737

*Table 21. Contents of anions in U. davidian var. japonica*

(mg%)

<i>Anion</i>	<i>Content</i>
Fluoride( $\text{F}^-$ )	0.041
Chlorite( $\text{ClO}_2^-$ )	0.039
Chloride( $\text{Cl}^-$ )	0.011
Nitrite( $\text{NO}_2^-$ )	0.009
Nitrate( $\text{NO}_3^-$ )	0.098
Phosphate( $\text{PO}_4^{3-}$ )	0.084
Sulfate( $\text{SO}_4^{2-}$ )	0.084

## 제2절 항산화 효능

### 1. *In vitro* 에서 유근피 에탄올 분획의 항산화 활성

#### 가. DPPH radical 소거작용

Free radical 로서 비교적 안정한 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용하여 유근피 에탄올 분획별 추출물의 free radical 소거 효과를 측정한 결과는 Table 22와 같다. 전자공여작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식품중의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되고, 인체내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용으로 이용되고 있다(68). 라디칼 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 전자공여능 측정은 DPPH 라디칼 소거법으로 측정하며, DPPH는 비교적 안정한 라디칼을 갖는 물질로 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되어 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 검정한다(69,70). DPPH는 아스코르브산, 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로서 항산화 물질의 전자공여능을 측정할 때 DPPH법이 유용한 방법으로 알려져 있다. DPPH 소거활성은 n-butanol>ethylacetate>chlorform>water>n-hexane 순이였고, 그 중 유근피 에탄올 추출물 n-butanol분획은 28.22 µg/ml로 DPPH radical 소거 효과를 보였다. 대조군으로 사용한 합성항산화제인 BHT 15.38 µg/mL와 n-butanol분획과 비교시 DPPH radical 소거능이 BHT만큼 우수하지 않았으나 분획물중 n-butanol분획이 가장 효과적인 전자공여능을 나타냈다. 따라서 유근피에 함유하고 있는 항산화 물질이 n-butanol에 잘 용해되는 것으로 추정된다.



*Table 22. Scavenging effects of UDEE fractions on DPPH radical*

<i>Fraction</i>	<i>IC<sub>50</sub>(<math>\mu</math>g/mL) <sup>1)</sup></i>
Control	0
n-Hexane	>100
Chloroform	67.51
Ethylacetate	36.73
n-Butanol	28.22
Water	84.67
BHT	15.38

<sup>1)</sup> Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

## 나. 항산화지수(AOM)

유근피 에탄올추출물 분획의 농도가 600 ppm이 되도록 유지에 가하고 Rancimat로 항산화지수를 측정한 결과는 Table 23과 같다. 유지에 일정한 온도로 가열하면서 공기를 주입하면 유지가 산화되기 시작하면서 carboxylic acid가 생성되고, 증류수의 전기 전도도를 증가시켜 검출기에서 유도기간을 산정하여 산화안전성을 평가하는 것으로 일정한 조건에서 유지 산패의 정도를 측정하거나 항산화제의 효율을 분석하는 것이다(71).

항산화지수는 n-butanol 분획의 AI가 1.38로 가장 높게 나타났으며, chloroform 분획의 AI는 1.09, ethylacetate의 AI는 1.30, water분획의 AI 1.02 n-hexane분획의 AI 10.1로 대조구의 항산화 지수 1.00보다 높은 활성을 나타냈다. 본 실험의 결과는 앞서 실험한 DPPH 소거능의 결과와 동일하였으며 유근피 에탄올추출물의 전 분획에서 대조구보다 높은 항산화활성을 나타냈는데 이는 유근피 에탄올추출물에 항산화활성을 나타내는 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 판단되며 우수한 항산화제로의 개발이 기대된다.

*Table 23. Antioxidative activities of UDEE fractions on soybean oil*

<i>Fraction</i> <sup>1)</sup>	<i>IP</i> <sup>2)</sup>	<i>AI</i> <sup>3)</sup>
Control	7.05 h	1.00
n-Hexane	7.10 h	1.01
Chloroform	7.72 h	1.09
Ethylacetate	9.18 h	1.30
n-Butanol	9.68 h	1.37
Water	7.21 h	1.02
BHT	13.96 h	1.97

<sup>1)</sup> Fractions were separated by separatory funnel.

<sup>2)</sup> Induction period of oil was determined by Rancimat's test at 110 °C.

<sup>3)</sup> Antioxidant index was expressed as IP of oil containing various fraction/IP of soybean oil.

## 다. 아질산염 소거작용

pH 변화에 따른 유근피 에탄올추출물 분획의 농도와 BHT의 농도 600 ppm에서 아질산염의 소거작용은 Fig. 2와 같다. 이들 pH 범위는 인체 내 위에서의 pH 변화를 고려하였으며, 각 pH (pH 1.2, 3.0, 6.0)에서 관찰 하였다. 유근피 에탄올추출물 분획의 아질산염 소거작용은 pH 1.2에서 가장 강하였고, pH의 증가에 따라 점차 감소하였다. pH 1.2의 경우 n-butanol 분획이 84.13%, ethylacetate 분획이 65.4%, chloroform 분획이 60.1%, n-hexane 분획이 46.2%였다. n-butanol분획이 타 분획보다 가장 높았으며 pH 4.2와 pH 6.0의 경우에서도 마찬가지였으며, pH가 상승할수록 효과는 감소하였다. 모든 pH에서 n-butanol분획이 타 분획보다 높았다. 강 등(72)의 연구에서도 마찬가지로 낮은 pH에서 높은 아질산염 소거효과를 나타내었다. 일반적으로 아질산염은 수산물이나 식육에 첨가하여 발색, 독소생성 억제 산패방지제로 널리 이용되고, 발암성 물질로 알려진 니트로사민의 전구물질로 아민을 함유하고 있는 식품물을 동시에 섭취했을 때 위내에서 니트로사민이 생성될 가능성이 매우 높다(73). 따라서 위내 환경이 pH 1.2에서 우수한 소능을 보인 유근피 에탄올 추출물의 분획물이 체내 니트로사민 생성을 감소시킬 수 있으리라 생각된다.

## 라. 지질과산화에 생성억제 작용

유근피 에탄올추출물 분획 600ppm 농도에서 항산화활성을 linoleic acid를 기질로 TBA값을 측정하여 비교한 결과는 Fig. 3과 같다.

각 분획의 지질과산화 억제율은 n-butanol 분획의 경우 87.32%, ethylacetate 분획이 64.23%, chloroform 분획이 44.02% 순으로 n-butanol분획에서 지질과산화 억제율이 가장 높았으나 대조구로 사용한 BHT의 억제율 보다는 낮았다. 이 결과는 phenol의 OH기가 DPPH용액에 존재하는 자유라디칼과 linoleic acid의 산화로 인해 생성되는 자유라디칼에 작용하는 차이 때문으로 생각된다(74).

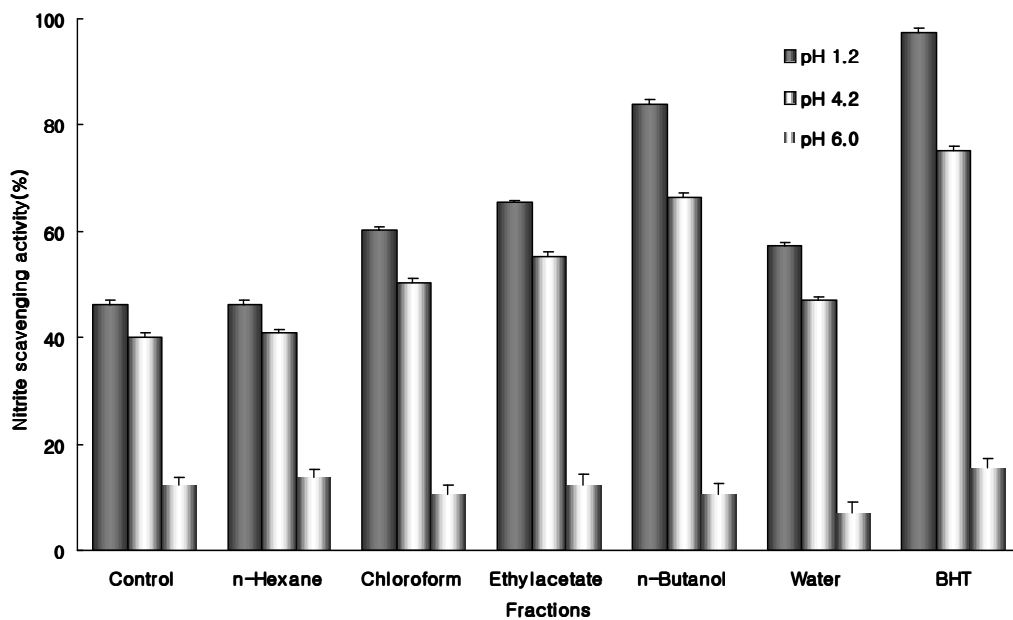


Fig. 2. Nitrite scavenging activity of UDEE fractions under different pH conditions

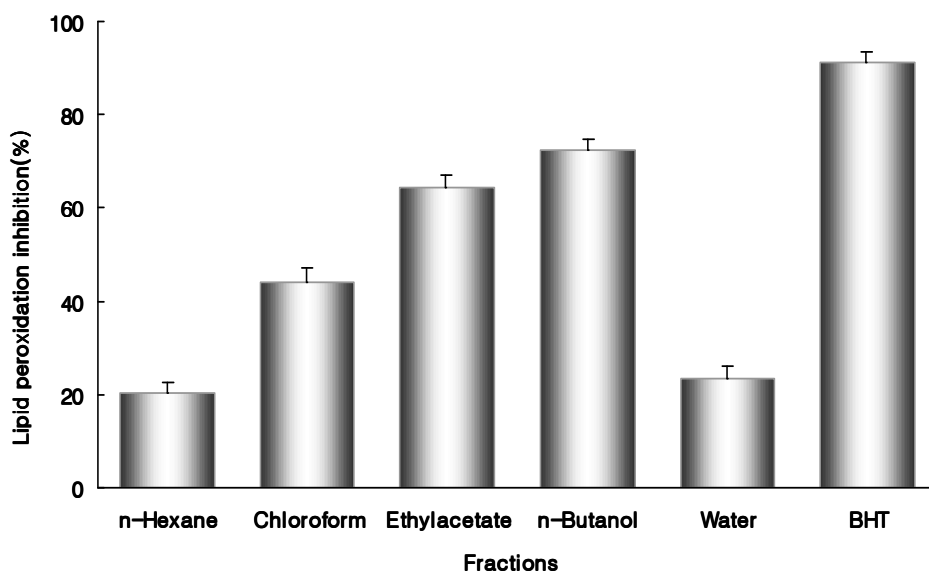


Fig. 3. Lipid peroxidation inhibitory activities of fractions of UDEE

### 마. *Linoleic acid*에 대한 항산화 작용

*Linoleic acid*에 50 °C에서 일정기간 동안(3, 5, 7, 10일) 저장시킨 유근피 에탄올 추출물 분획 600ppm을 첨가하여 생성된 과산화물가(peroxide value, POV)를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다.

3일 저장에서 POV는 n-butanol 208 meq/kg, ethylacetate 213 meq/kg, chloroform 328 meq/kg, water 390 meq/kg 순으로 높았고, 5일 저장에서는 n-butanol 398 meq/kg, ethylacetate 390 meq/kg, chloroform 579 meq/kg, water 479 meq/kg 순으로, 7일간 저장에서도 같았다. 이 결과는 용매추출에 의한 항산화 물질의 양이 n-butanol, ethylacetate으로 추출 시 높았기 때문으로 생각되며 분획의 항산화력과 POV사이에는 역상관관계가 있음을 알 수 있었다.

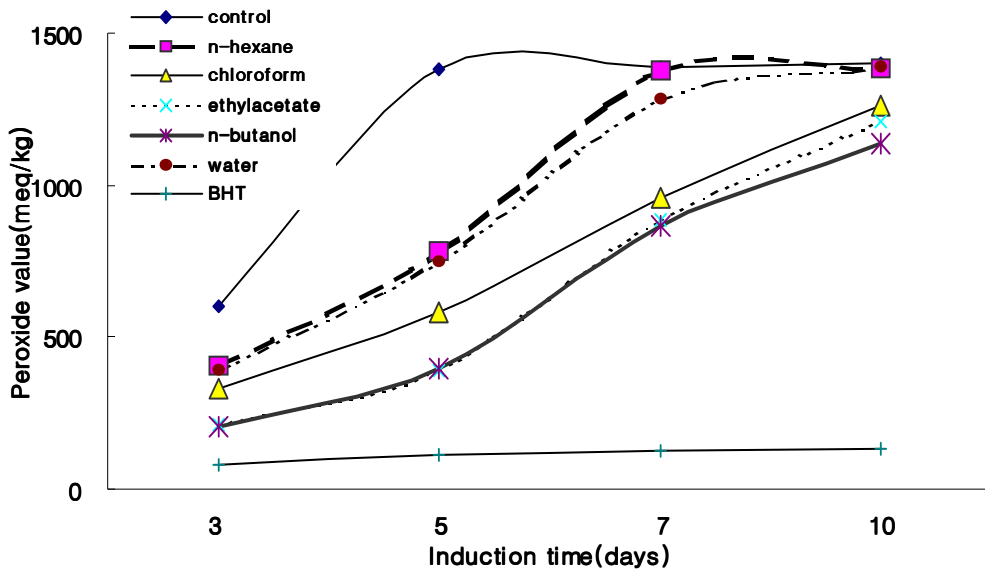
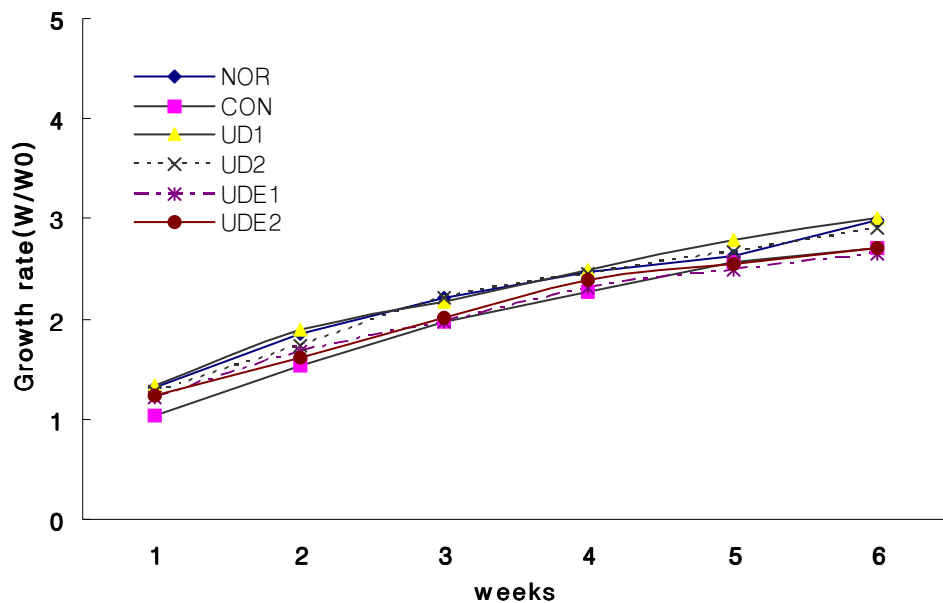


Fig. 4. Change of peroxide value in linoleic acid emulsion added fractions of UDEE during incubation at 50 °C for 10 days

## 2. *In vivo* 에서 유근피 에탄올 추출물의 항산화 효능

### 가. 체중증가율 및 식이효율

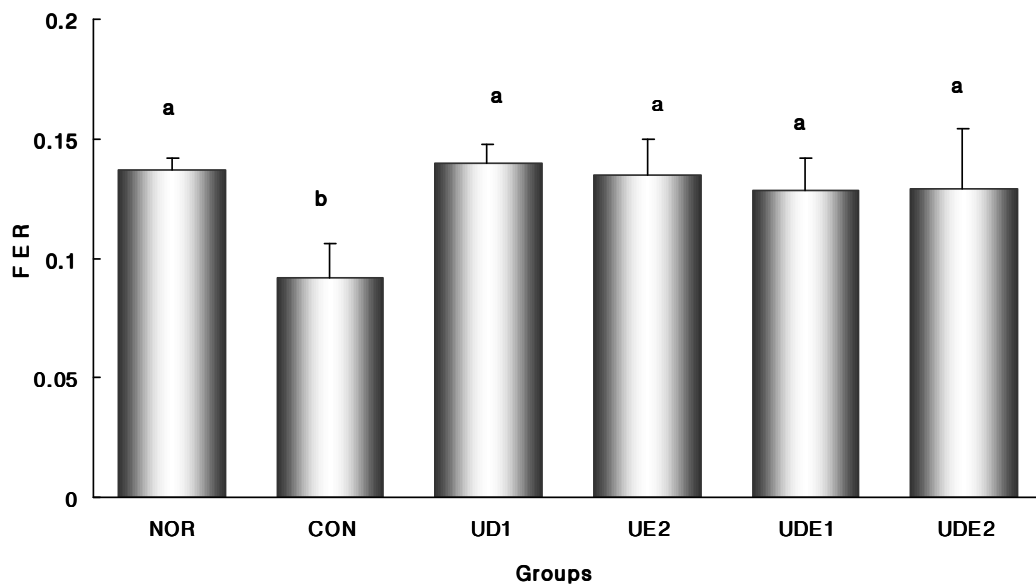
유근피 에탄올 추출물과 알코올을 6주간 투여하여 측정된 흰쥐의 체중증가율 및 식이효율은 Fig. 5, 6와 같다. 6주간의 체중 증가율에서, 대조군은 정상군에 비하여 현저히 감소되었으나, 알코올과 유근피 에탄올 소량(200 mg/kg) 및 다량 병합투여군(400 mg/kg)은 알코올투여로 감소된 체중을 정상군에 근접토록 유의하게 증가시켰으나 투여량에 따른 변화는 나타나지 않았다. 식이효율은 대조군이  $0.092 \pm 0.009$ 로 정상군  $0.137 \pm 0.005$ 에 비하여 유의적으로 저하되었으나 유근피를 용량별 병합투여함으로써 UDE1군과 UDE2군에서 정상군에 가깝게 식이효율이 증가되었다. 이 결과는 알코올 섭취시 체중 및 식이 섭취량이 감소되었다는 Lieber(75)와 Show 등(76)의 보고와 일치하였고, 알코올 중독 환자들에 있어서도 식이 섭취량이 유의적으로 감소되었다는 결과와 유사하다. 이는 위장과 소장에서 주로 흡수되는 알코올은 간으로 이동하여 대사되는데, 알코올에 의한 간 손상 기전은 알코올 자체에 의한 직접적인 요인과 영양불량 등 간접적 요인에 의한 것으로(77) 알코올 독성에 의한 소화율 감소와 영양소 흡수율 저하 및 알코올을 과량 섭취할 때 나타날 수 있는 에너지효율의 감소 때문인 것으로 생각된다.



*Fig. 5. The growth rate in alcohol and/or UDEE administered rats*

Abbreviations : growth rate ( $W_1/W_0$ ) : ratio of the body weight ( $W_1$ ) to initial body weight ( $W_0$ ). See the legend of Table 12.





*Fig. 6. The FER in alcohol and/or UDEE administered rats.*

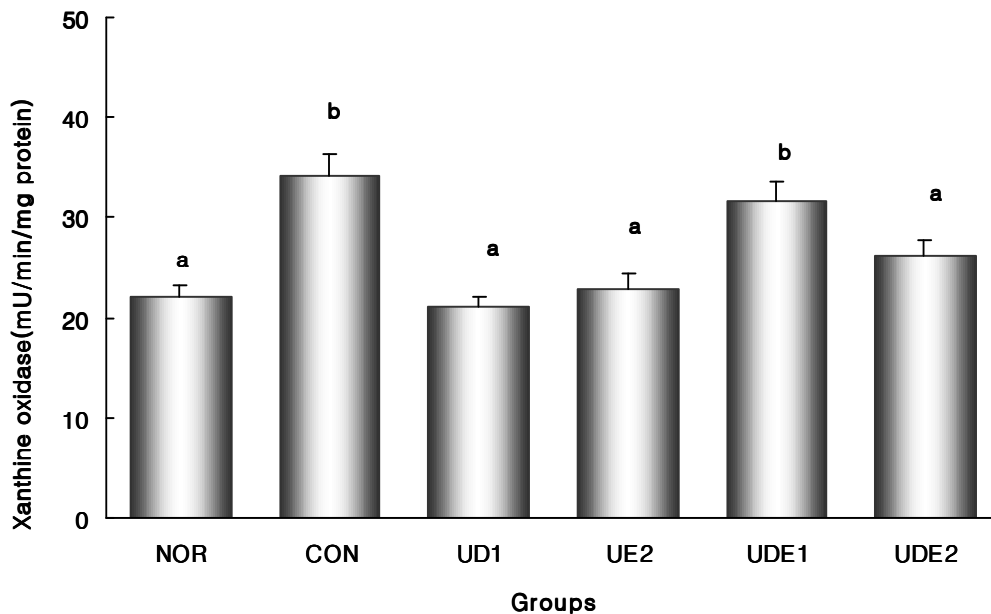
Abbreviations: FER(feed efficiency ratio) : the total amount of weight increased/the total intake of food. See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

## 나. 간 조직 중 항산화 효소 활성

### (1) 유리기 생성계 효소(XO)활성

Xanthine을 기질로 하여 요산을 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소로 알려진 XO활성을 간조직에서 측정한 결과는 Fig. 7과 같다.

흰쥐의 간 조직 중 XO활성에서, 알코올투여로 대조군은  $34.23 \pm 2.11$  units로 정상군  $22.04 \pm 1.23$  units에 비하여 35% 증가되었다. 이 결과는 xenobiotics 투여시 급성 간 손상이 유도되고 그로 인하여 간세포가 괴사되어 핵 분해가 초래되며(78), 간이 손상을 받으면 ATP량이 감소되어 purine대사가 촉진됨으로서 XO활성이 증가되고 이로 인하여  $O_2^-$  생성이 증가되어 나타나는 산화적 손상인 것으로 생각된다. 유근피 에탄올 추출물을 병합 투여함으로서 UDE1군 ( $31.58 \pm 1.95$  units)과 UDE2군( $26.08 \pm 1.64$  units)에서 대조군에 비해 증가된 XO활성이 유의하게 감소되었다. 이는 알코올을 실험동물에 만성적으로 섭취시킬 때 XO활성의 증가로 oxygen free radical 생성되었으며, 유근피 에탄올 추출물 투여 후 free radical의 생성을 감소시킨 것으로 생각된다.



*Fig. 7. Activities of XO in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE*

Abbreviations : See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

## (2) 유리기 해독계 효소(SOD, catalase 및 GSH-Px)활성

흰쥐에 유근피 에탄올추출물과 알코올을 6주간 투여 후 생체내 유리기 해독에 관여하는 SOD, catalase, GSH-Px활성을 측정한 결과는 Fig. 8~10과 같다.

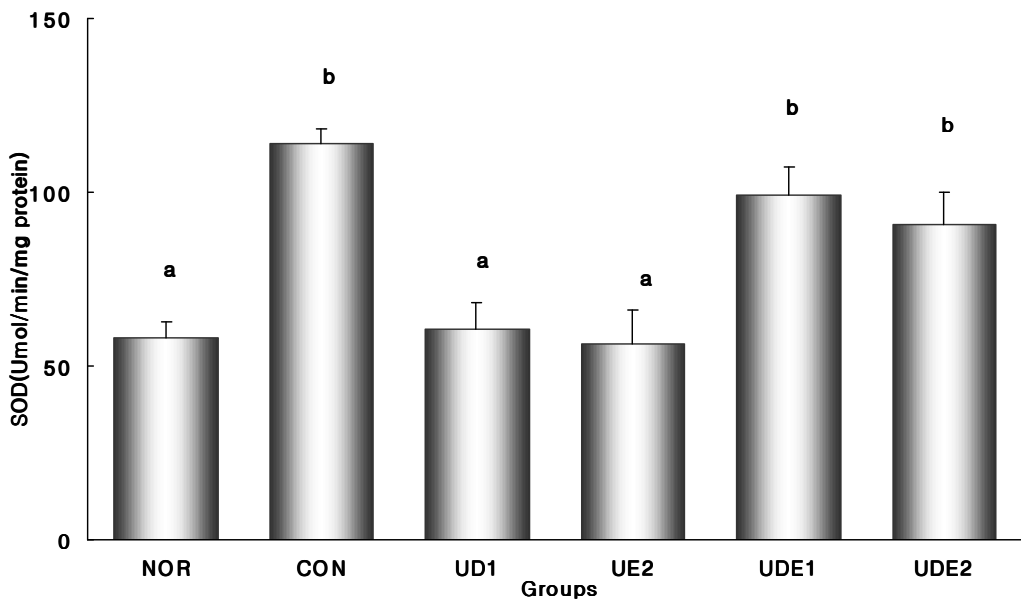
SOD는 superoxide anion radical( $O_2^-$ )을 보다 반응성이 약한 과산화수소( $H_2O_2$ )로 전환시켜 이때 생성된  $H_2O_2$ 는 GSH-Px, catalase 등의 작용에 의해  $H_2O$ 로 무독화 됨으로써 산소독 으로부터 생체를 보호하게 되는  $O_2^-$  소거효소이다(79). 대조군의 SOD활성은  $114.12 \pm 3.89$  units로 정상군  $58.23 \pm 4.52$  units에 비하여 49% 증가되었으며, 알코올투여로 증가된 활성산소( $O_2^-$ )를 소거하려는 생리 적응 현상으로 생각된다. 유근피 에탄올 병합 투여군인 UDE1군  $99.15 \pm 8.14$  units과 UDE2군  $90.48 \pm 9.65$  units로 각각 13%와 21% 감소되었다.

Catalase 활성은 대조군이  $499.24 \pm 20.42$  units로 정상군  $301.77 \pm 29.37$  units에 비하여 39.55% 유의하게 증가되었는데 유근피 에탄올추출물 투여로 UDE1  $351.19 \pm 17.45$  units와 UDE2  $326.13 \pm 21.36$  units으로 증가된 활성을 29%와 34% 유의적으로 감소시켰다. catalase는 대사 과정 중 발생하는 활성 산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라 이들 활성산소에 의해 비가역적으로 불활성화 될 수도 있으며, 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 것으로 보고되었다(80). 에탄올투여로 인하여 catalase활성도가 증가된 것은  $H_2O_2$ 와 같은 free radical생성이 증가되어 나타난 결과로 생각된다.

간 조직 중 GSH-Px 활성은 대조군이  $114.56 \pm 12.53$  units로 정상군  $79.41 \pm 8.45$  units에 30%비하여 증가되었으나 유근피 에탄올추출물투여로 UDE1군과 UDE2군은 각각 17%와 22% 감소하였다. GSH-Px는 세포질과 사립체내에 존재하므로 사립체내에서 생성된  $H_2O_2$ 의 소거에 일차적으로 작용하며  $K_m$ 값이 낮기 때문에  $H_2O_2$ 농도가 낮을 때에도 작용한다.

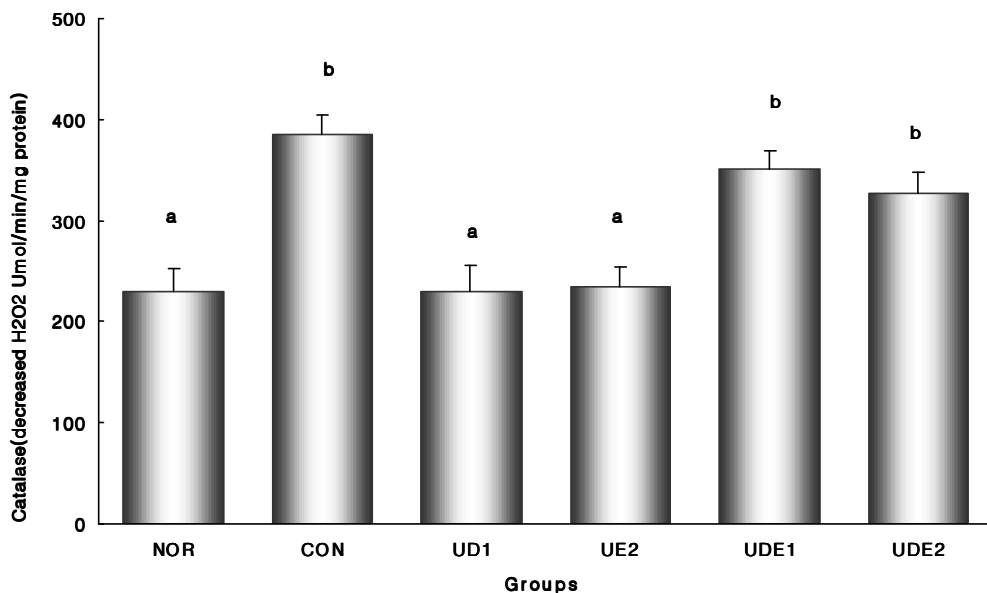
또한 selenium(Se)을 함유하는 항산화효소로 체내에서  $NADP^+$ 를 전자수용체로 GSH를 산화형 glutathione(GSSG)과 물 그리고 기타 과산화물을 생성하는

반응을 촉매 함으로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산소독을 해독하는 효소(81)이다. 생성된 GSSG는 NADPH를 전자공여체로 glutathione reductase에 의해 GSH로 환원되며 NADPH는 주로 hexose monophosphate pathway(HMP)에 의해서 공급된다(82). 이처럼 알코올 투여군의 GSH-Px 활성이 높게 나타나는 것은 알코올의 산화 작용으로 인해 증가되는 산화물들의 환원을 위한 것으로 사료되며, 이러한 결과는 알코올의 섭취가 간조직내 GSH의 단백질 양을 감소시키고, 이차적으로 자유기 생성에 의한 지질과산화 반응을 일으킨다는 보고(83)와 관련됨을 보여준다.



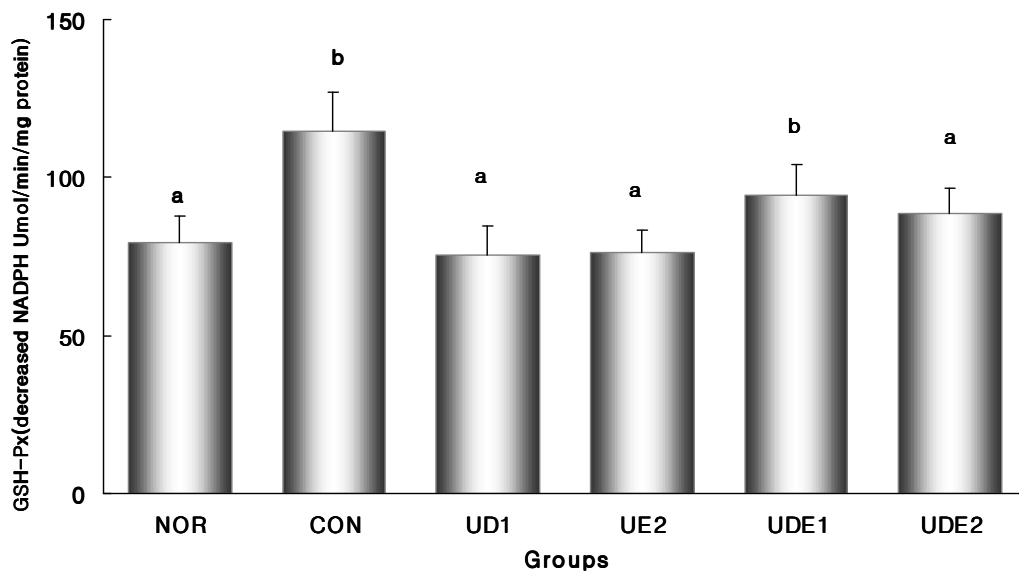
*Fig. 8. Activities of SOD in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE*

Abbreviations : See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 9. Activities of catalase in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 10. Activities of GSH-Px in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE*

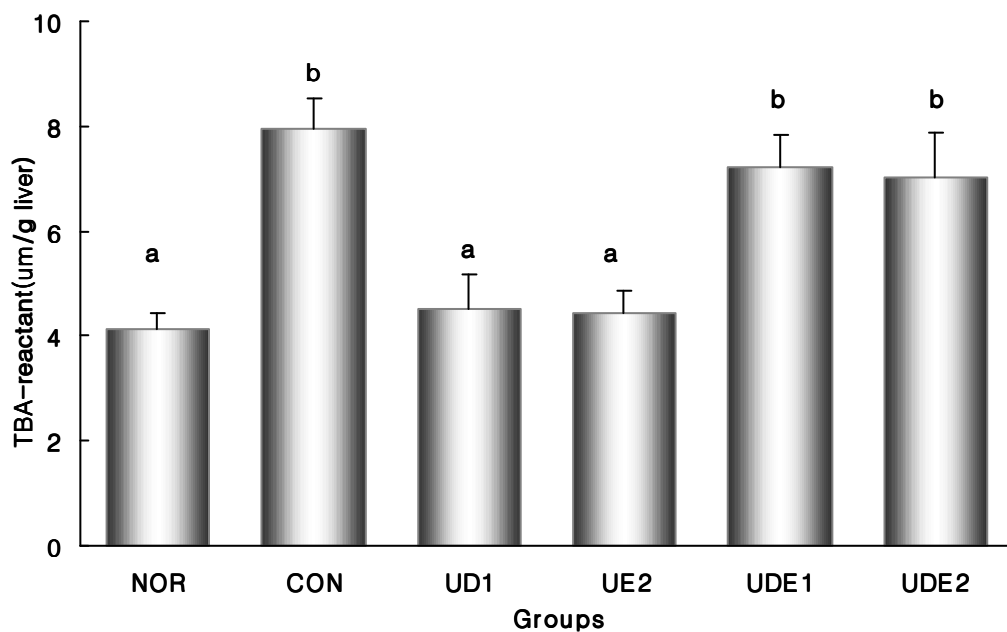
Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

#### 다. 간 조직 중 과산화지질 함량

유근피 에탄올추출물 200 mg/kg과 400 mg/kg 및 알코올을 6주간 투여 후 흰 쥐의 간 조직 중 과산화지질의 함량은 Fig. 11과 같다.

에탄올이 초래하는 간조직 손상도를 보기위해 측정된 산소라디칼 유래 조직의 산화성 손상 지표중의 하나인 TBARS의 함량은 대조군에서  $7.95 \pm 0.47 \mu\text{m/g}$ 으로 정상군인  $4.12 \pm 1.08 \mu\text{m/g}$ 에 비해 48% 유의적으로 증가되어, 장기 에탄올 투여에 의하여 산화성 손상을 받고 있음이 나타났다. 이는 알코올의 투여가 ree radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인하여 생성되며(84), 급성 혹은 만성적인 알코올투여가 간 조직 중 지질과산화물량을 증가시킨다는 보고(85)와 일치한다. 또한 유근피 에탄올추출물 다량투여군은  $7.01 \pm 0.42 \mu\text{m/g}$  liver로 알코올 투여로 증가된 간 조직 중의 과산화지질 함량을 대조군에 비해 감소시켰으나 유의성 있는 변화는 나타내지 않았다.





*Fig. 11. Contents of TBARS in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

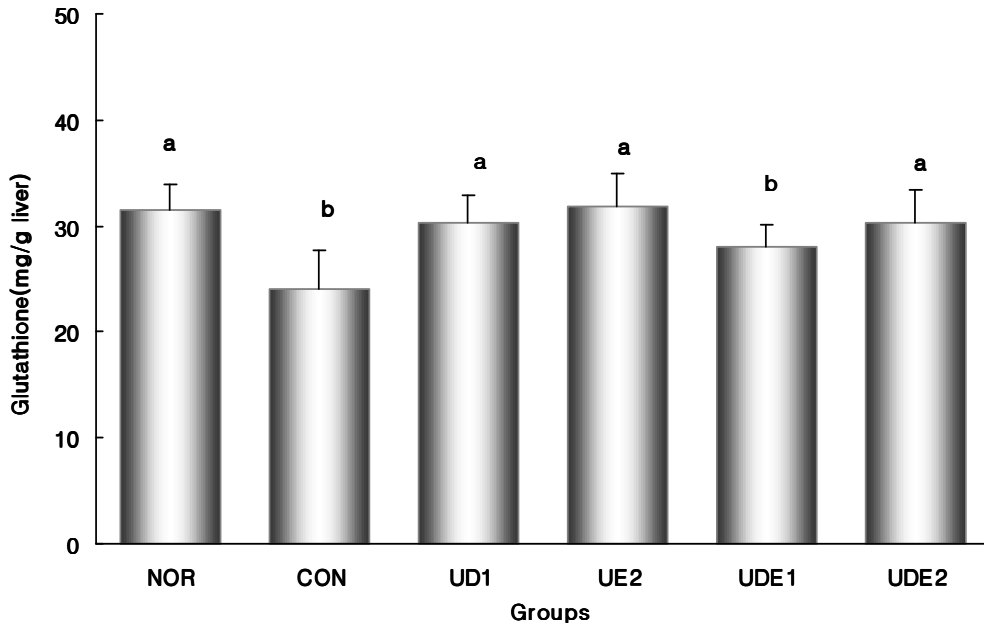
## 라. 간 조직 중 GSH함량

흰쥐에 유근피 에탄올추출물 200 mg/kg과 400 mg/kg 및 알코올을 6주간 투여 후 간 조직 중 GSH함량의 변화를 측정한 결과는 Fig. 12와 같다.

유근피 에탄올추출물 단독 투여군은  $30.24 \pm 2.66$  mg/g로 정상군  $31.45 \pm 2.54$  mg/g 에 비하여 큰 변화를 나타내지 않았으나, 알코올 투여로  $24.12 \pm 3.51$  mg/g로 GSH함량이 정상군에 비하여 현저히 감소되었다. 그러나 유근피 에탄올추출물과 알코올 병합투여군인 UDE1  $24.02 \pm 0.9$  mg/g 과 UDE2  $30.12 \pm 3.13$  mg/g 알코올 투여로 감소된 GSH함량을 증가시켰으며, 특히 유근피 에탄올 추출물 다량 추출물군에서는 정상군에 가까운 GSH의 증가량을 보여 주었다.

GSH는 주로 생체내에서 환원상태로 존재하며, DNA 합성 물질 이동, 효소 활성의 조절, 활성산소나 free radical에 의한 세포 손상 예방 등에 직접 또는 간접으로 관여한다(83). GSH는 간조직의 항산화상태 뿐만 아니라 산화적 스트레스의 영향을 나타내고, 함량이 낮을 경우 세포손상 및 독성에 대한 민감도가 높아지므로 체내 GSH 함량의 감소는 간질환과 관계된다. 알코올에 의한 간 조직 중 GSH함량의 감소기전에 대해서는 아직도 많은 논란이 있으나 문헌상에 나타난 연구 결과들은 에탄올 대사산물인 acetaldehyde가 GSH와 직접 작용하여 함량이 감소되거나(83), 에탄올에 의하여 생성된 과산화지질이 GSH와 반응하여 산화됨으로서 GSH함량이 감소된다는지(86), GSH의 합성전구체인 cysteine이나 glycine이 알코올 대사산물인 acetaldehyde와 반응함으로서 간접적으로 GSH함량이 감소되고, 그 외 에탄올이 각종 호르몬 분비를 촉진시켜 조직내 GSH함량의 감소가 일어나고 이차적으로 free radical에 의한 지질과산화 반응이 촉진됨이 보고되었다(87). 알코올투여로 간 중 GSH함량이 정상군에 비하여 낮게 나타났는데 이는 Oh등(86)의 연구결과와 비슷하며, 유근피 에탄올추출물과 알코올 병합투여군이 대조군보다 GSH함량이 높게 나타난 것은 유근피 에탄올추출물이 알코올에 의해 생성된  $H_2O_2$  등 free radical를 소거하여

GSH-Px를 소모시킴으로서 그 양이 감소되어 나타난 결과로 추정되며, 이 결과는 유근피 에탄올추출물과 알코올 병합투여군의 thiobarbituric acid 반응성 산물 양이 대조군에 비하여 낮게 나타난 것과 연관성이 있을 것으로 생각된다.



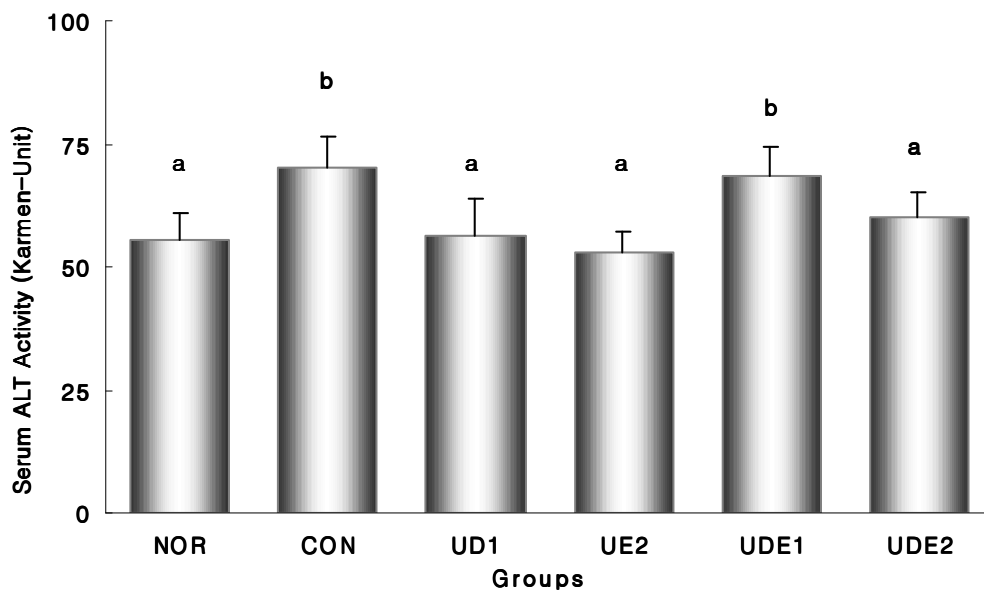
*Fig. 12. Contents of GSH in the liver of rats administered alcohol and/or UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

## 마. 혈청 중 *ALT*, *AST* 및 *ALP* 활성

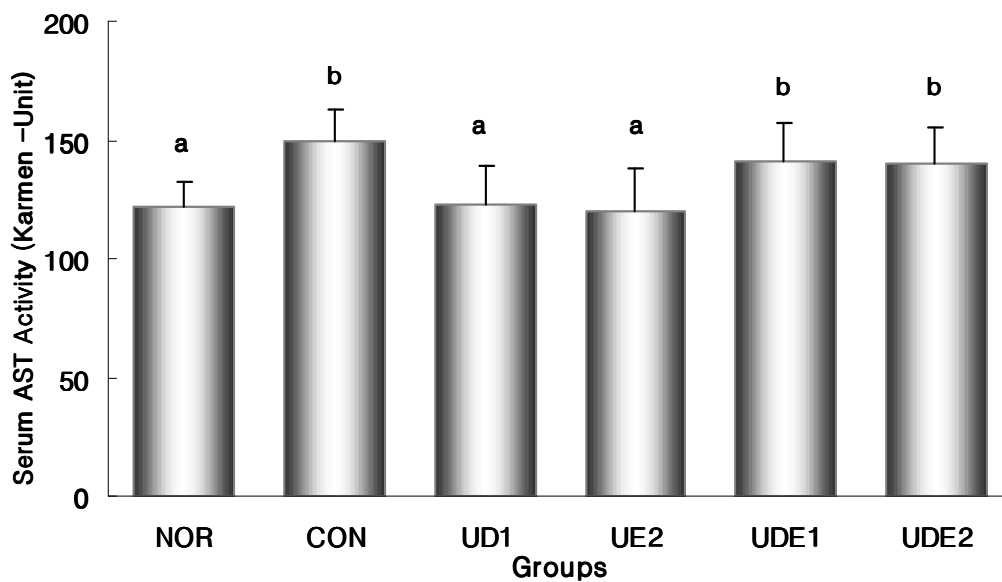
흰쥐에 알코올 및 유근피 추출물을 6주간 투여 후 간손상의 지표로 사용되어지는 혈청 중의 *ALT*, *AST* 및 *ALP* 활성(87)의 변화는 Fig. 13~15와 같다. *ALT*의 경우 에탄올 단독 투여로 대조군이 정상군에 비해 20.7%의 증가로 유의적인 차이를 보였으며, 유근피 에탄올 추출물을 병합하여 투여한 UDE1군과 UDE2군은 대조군에 비해 각각 3%와 14%와 감소되는 결과를 얻었다. 이는 유근피 에탄올 추출물이 알코올 섭취로 인한 간기능 손상에 효과가 있음을 알 수 있었다. *AST*의 경우 대조군이 정상군에 비해 18% 유의적인 증가를 나타냈으나 유근피 에탄올 추출물을 병합 투여한 UDE1군과 UDE2군은 4%와 6%로 알코올 투여로 증가된 *AST*를 감소시켰다. 이상의 실험결과에서 유근피 에탄올 추출물투여로 알코올에 의해 증가된 *AST*, *ALT*가 감소되었음은 알코올로 인하여 유발된 간세포손상이 차츰 회복되어 가는 것으로 사료되어진다.

또한 *ALP*의 활성의 경우 Fig. 15에 나타내었으며 에탄올 단독 투여로 대조군( $198.54 \pm 15.32$ )경우 정상군( $149.85 \pm 11.45$ )에 비해 22.32%증가된 활성을 보였으며, 유근피 에탄올 병합 투여로 인하여 UDE1 ( $190.11 \pm 11.45$ )군과 UDE2 ( $184.53 \pm 14.52$ )군은 대조군에 비하여 각각 4%와 7% 감소되었다.



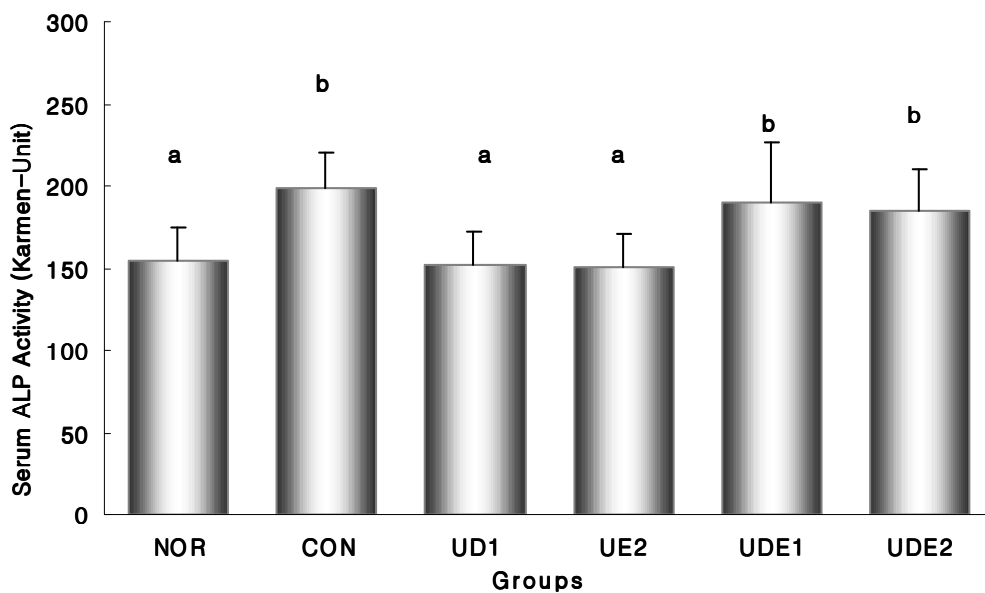
*Fig. 13. Activities of ALT in the serum of rats administered alcohol and/or UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Turkey(T)-test.



*Fig. 14. Activities of AST in the serum of rats administered alcohol and/or UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Turkey (T)-test.



*Fig. 15. Activities of ALP in the serum of rats administered alcohol and/or UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Turkey (T)-test.

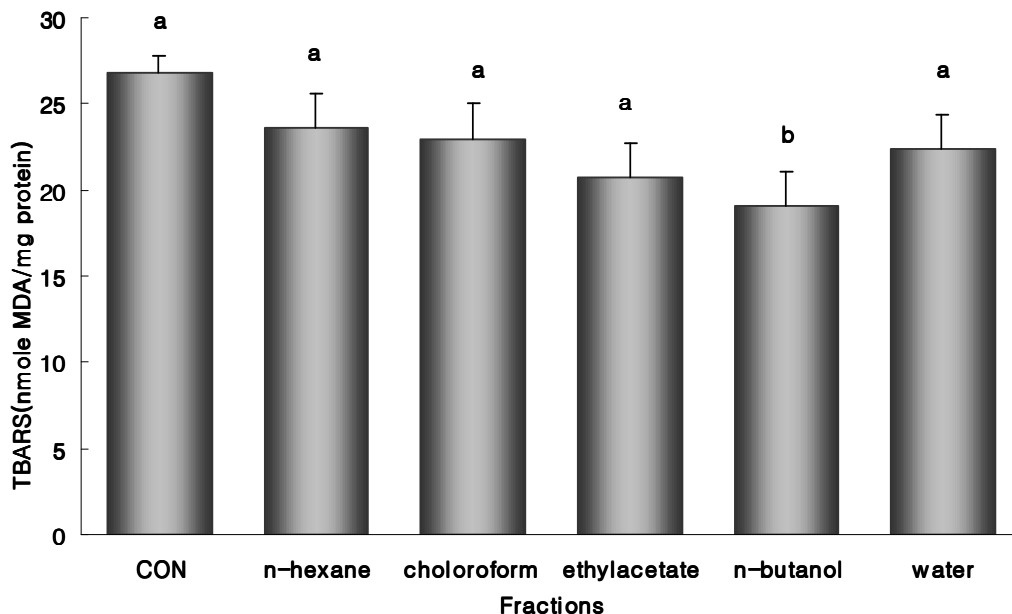
### 제3절 고지혈증 억제 효능

#### 1. *In vitro* 에서 고지혈증억제 효과

##### 가. LDL에 대한 항산화 효과

LDL에 대한 유근피 에탄올 추출물의 분획별 항산화 효과를 측정 한 결과는 Fig. 16과 같다. 시료 무첨가군인 대조군의 TBARS함량은 26.8 nmole MDA/mg protein, n-hexane분획은 23.56 nmole MDA/mg protein, chloroform 분획은 22.95 nmole MDA/mg protein, ethylacetate 분획은 20.7 nmole MDA/mg protein, n-butanol 19.08분획은 nmole MDA/mg protein, water 분획은 22.34 nmole MDA/mg protein으로 대조군에 비해 저해 활성을 보였으며 그 중 n-butanol 19.08 nmole MDA/mg protein로 대조군의 TBARS의 비교했을 때 28% 억제 되었다. 이는 유근피 에탄올 추출물의 계통별 분획의 항산화 활성이 산화된 LDL 내의 지질과산화물질의 축적으로 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 세포의존성 동맥경화의 초기단계를 예방할 수 있는 기능성 물질로 이용할 수 있음을 시사해 주고 있다.





*Fig. 16. The inhibitory effect of UDEE fractions on LDL oxidation*

LDL was incubated with 16  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  at 37°C under air for 2 hr in the presence of 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations of fractions of UDEE. The reaction mixture was stopped by adding 3 mL of TBA-TCA-HCl solution, and then the solution was heated at 95°C for 30 min. After centrifugation to clarify the solution, the peak absorbance at 532 nm was used to calculate TBARS using and is expressed as nmol malondialdehyd equivalents/ mL. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Turkey(T)-test.

## 2. *In vivo* 에서 고지혈증억제 효능

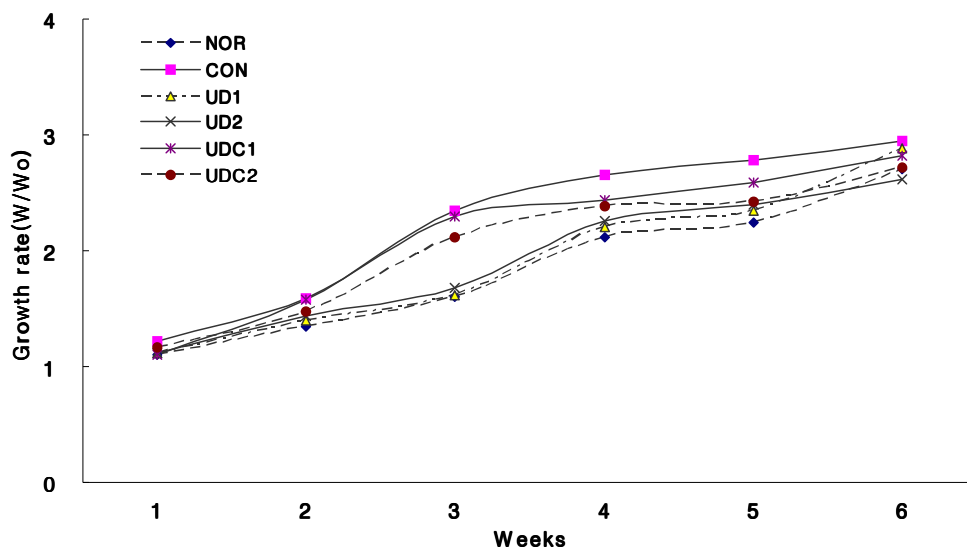
### 가. 체중증가율, 식이효율 간장/체중비율

정상 식이군, 고지혈증 대조군 그리고 유근피 에탄올 추출물의 용량을 달리한 투여군의 6주간 체중증가율, 식이효율 및 간장/체중 비율은 Fig. 17~19와 같다.

고지혈증 유발식이를 투여한 대조군은 정상군에 비하여 3주 이후부터 유의적으로 정상군( $1.76 \pm 0.08$ )에 비해 대조군 ( $2.13 \pm 1.01$ )이 18%정도 증가 되었으며, 유근피 에탄올 추출물을 병합 투여한 UDC1과 UDC2군에서는 대조군에 비하여 체중증가량이 감소되었다.

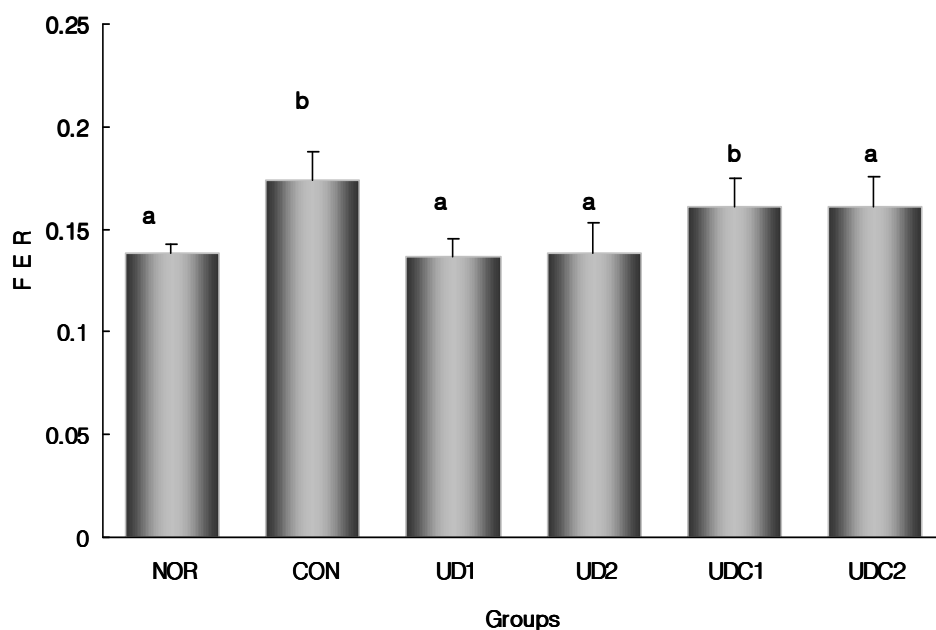
식이효율은 6주에 대조군이  $0.174 \pm 0.01$ 로 정상군  $0.138 \pm 0.05$ 에 비하여 상승하였으나 유근피 소량 및 다량 투여로 유의적인 차이는 나타내지 않았다.

체중 당 간조직의 무게는 고콜레스테롤 급여군 모두가 정상군에 비하여 높았으나, 유근피 에탄올 추출물을 병합 투여군인 UDC1군( $3.51 \pm 0.31$ )과 UDC2( $3.57 \pm 0.45$ )군이 대조군( $3.95 \pm 0.14$ )에 비하여 낮았다. 이는 식이 중 콜레스테롤 첨가로 간장 중 콜레스테롤 및 중성지방 등이 축적되어 간의 무게가 증가된 것(88,89)으로 생각되며 이는 이 등(90,91)의 보고와 유사하였다. 대조군에 비해 유근피 에탄올추출물을 병합투여한 군에서 감소한 것은 유근피 에탄올추출물이 간의 지방 축적을 저해했기 때문으로 사료된다.



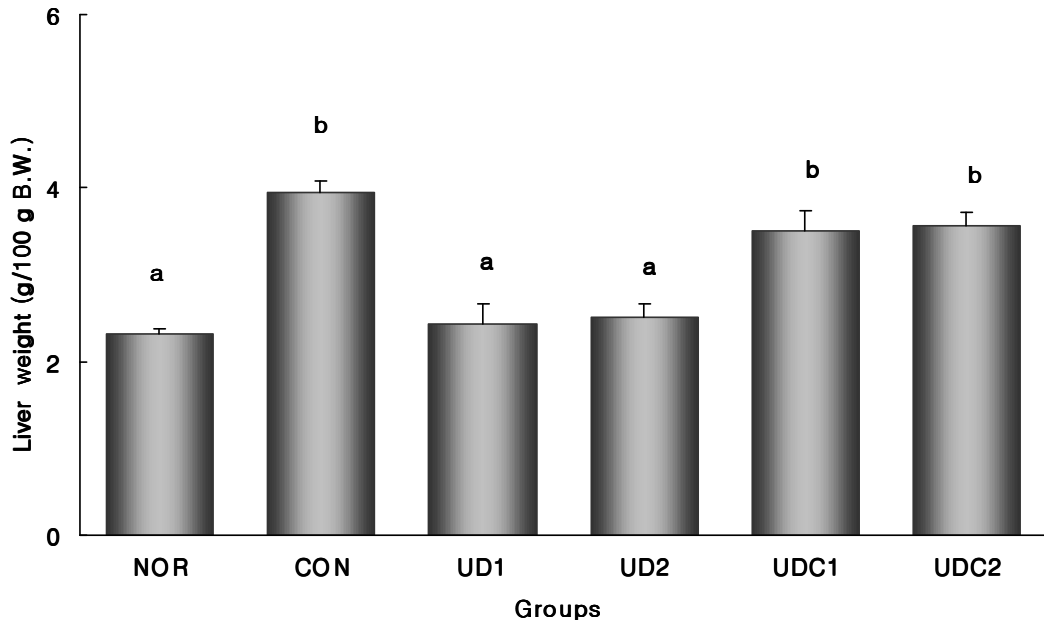
*Fig. 17. The change of growth rate of the rats fed high cholesterol diet with UDEE.*

Abbreviations: Growth rate ( $W_1/W_0$ ) : Ratio of the body weight ( $W_1$ ) to initial body weight ( $W_0$ ). See the legend of Table 12.



*Fig. 18. The FER of the rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: FER(feed efficiency ratio) : The total amount of weight increased/the total intake of food. See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 19. Effect of UDEE diets on liver weight of rats fed high cholesterol diet*

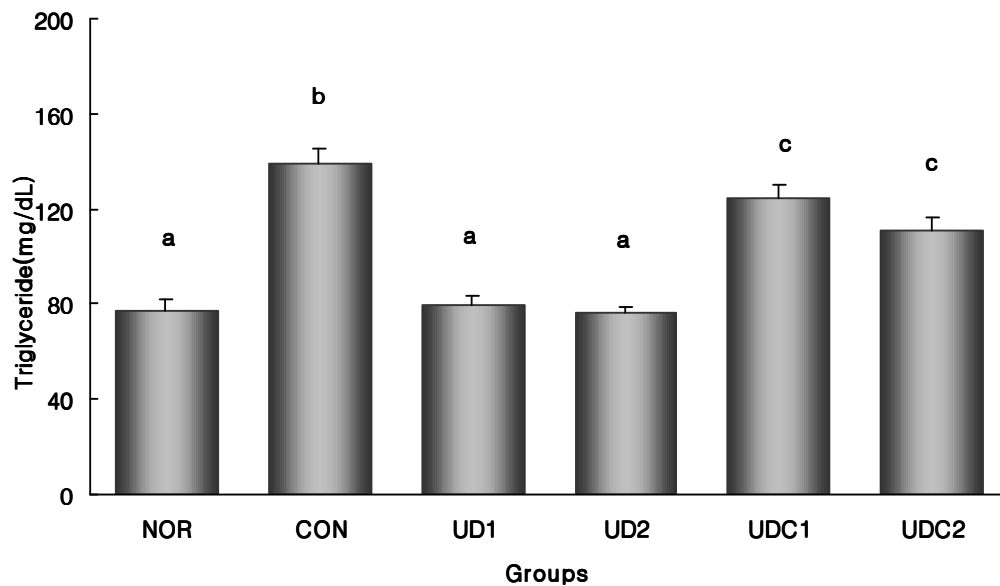
Abbreviations: Liver weight : Liver of weight /Body weight. See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Turkey(T)-test.

## 나. 혈청 중 중성지질, 총콜레스테롤 및 인지질 함량

흰쥐에 고콜레스테롤식이 및 유근피 에탄올추출물 200 mg/kg과 400 mg/kg을 6주간 투여 후 혈청 중성지질, 총콜레스테롤 및 인지질함량의 변화는 Fig. 20~22와 같다. 고콜레스테롤 식이를 급여한 대조군의 중성지질의 농도는  $138.96 \pm 3.14$  mg/dL로 정상군  $77.46 \pm 4.10$  mg/dL에 비하여 55.74% 유의적인 증가를 나타냈다. 유근피 에탄올추출물 병합 투여한 UDC1군과 UDC2군은 대조군에 비해 각각 10%와 20% 감소되었다.

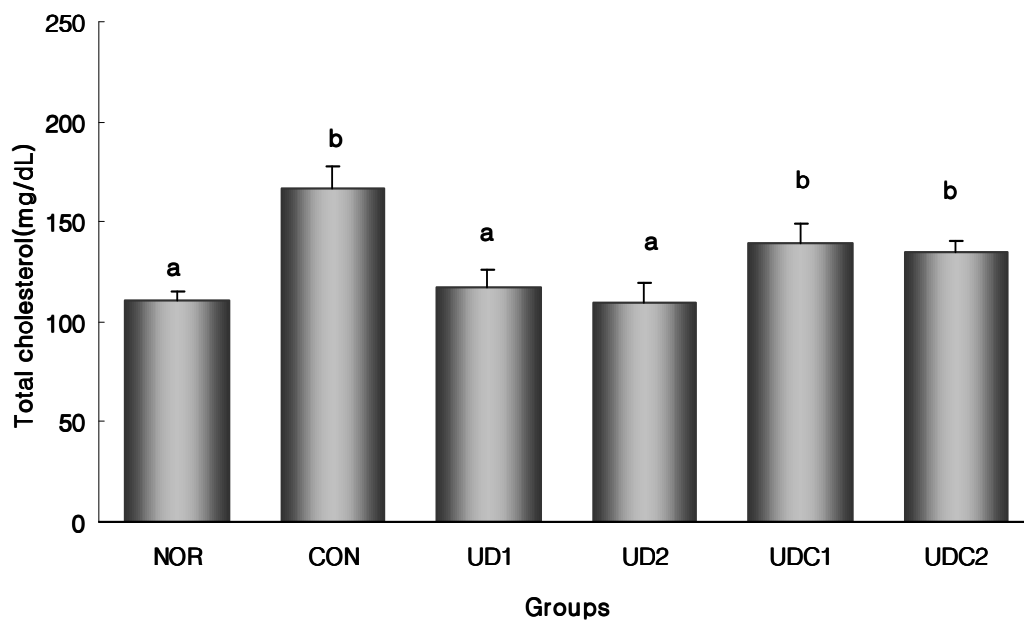
총콜레스테롤 농도는 대조군( $166.42 \pm 10.87$  mg/dL)이 정상군( $110.56 \pm 4.25$  mg/dL)에 비하여 33% 유의한 증가를 나타냈으며, 장 등(92)의 보고처럼 식이 콜레스테롤에 의한 간장내 유리콜레스테롤 및 콜레스테릴 에스테르의 축적이 일어났기 때문으로 추정된다. 유근피 에탄올추출물 병합 투여로 고콜레스테롤 식이로 증가된 총콜레스테롤함량을 UDC1군( $139.66 \pm 13.05$  mg/dL)과 UDC2군( $134.67 \pm 10.23$  mg/dL)에서 각각 16%와 19% 감소되었다.

인지질 함량은 대조군( $148.79 \pm 10.51$  mg/dL)이 정상군( $221.51 \pm 12.34$  mg/dL)에 비해 32.8% 유의적 감소를 나타냈으나, 유근피 에탄올추출물 병합투여로 UDC1군은 14%, UDC2군 15%로 증가 되었다. 고지방식이로 인한 지방간 발병의 주된 원인은 인지질 합성의 감소로 인한 것으로 보고(93)되고 있는데, 유근피 에탄올추출물을 병합 투여할 때 대조군에 비하여 증가되었음은 유근피 에탄올추출물이 지방간 진행을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 예방할 수 있을 것으로 추정된다.



*Fig. 20. Contents of triglyceride in the rats fed high cholesterol diet with UDEE*

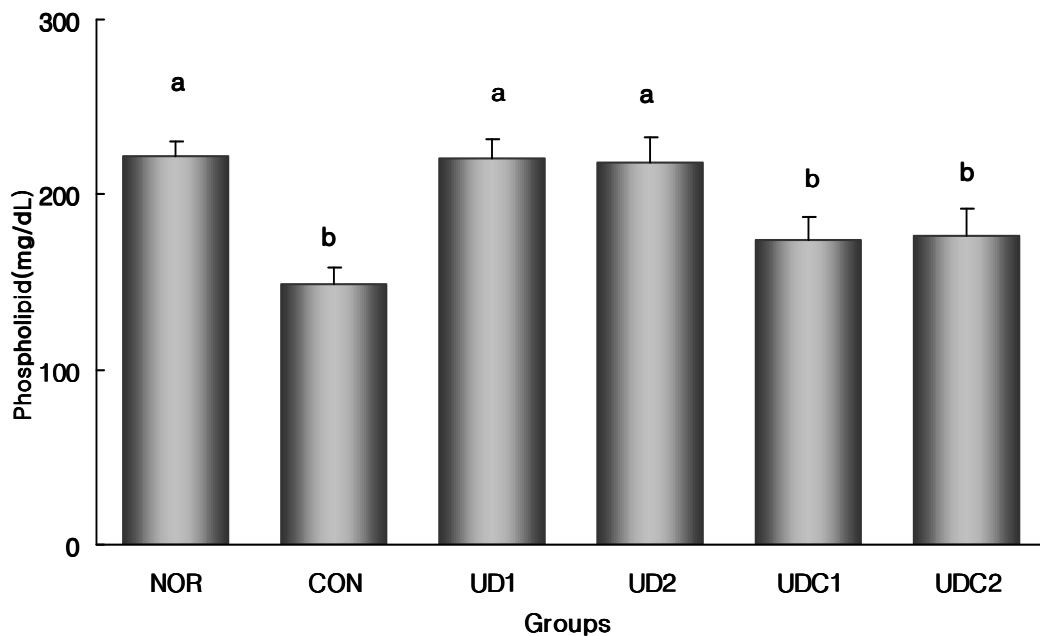
Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 21. Contents of total cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .





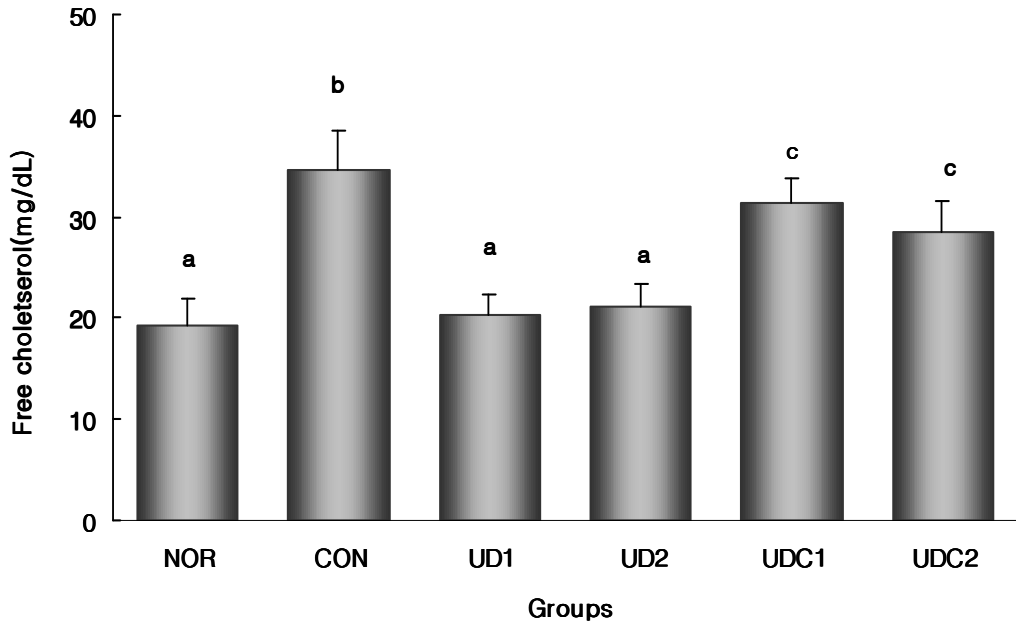
*Fig. 22. Contents of phospholipid in the rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

## 다. 혈청 중 유리콜레스테롤, 콜레스테릴 에스테르농도 및 콜레스테릴 에스테르 비율

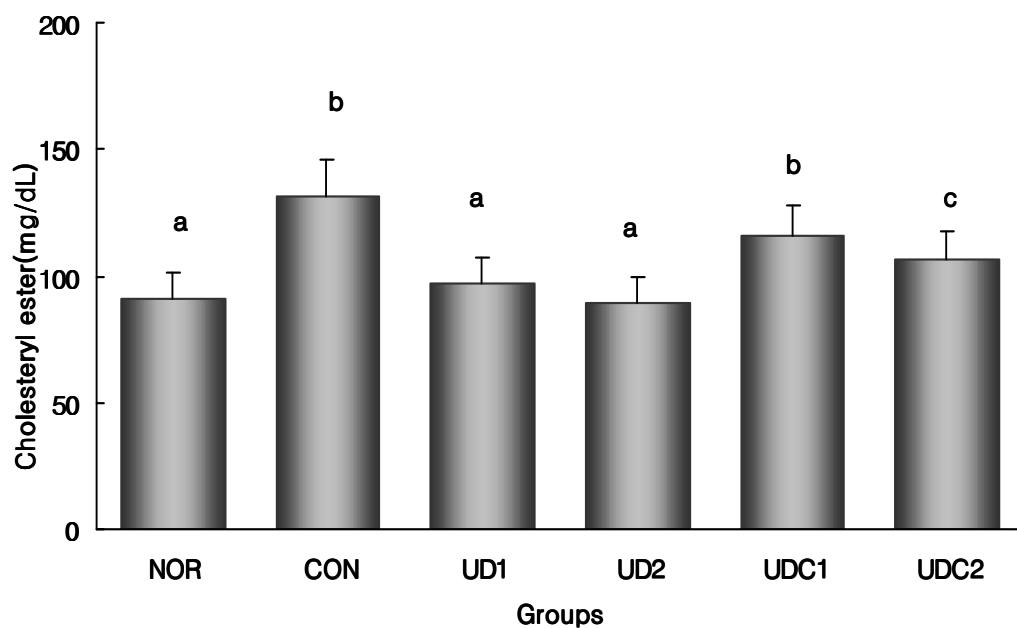
고콜레스테롤식이와 유근피 에탄올추출물 투여량을 다르게 투여한 흰쥐의 혈청 중 유리콜레스테롤, 콜레스테릴 에스테르 농도 및 콜레스테릴 에스테르의 비율은 Fig. 23~25와 같다. 유리콜레스테롤 농도는 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이만을 급여한 대조군이 20%증가 하였고, 유근피 에탄올추출물 병합투여로 UDC1( $31.48 \pm 2.79$  mg/dL)군과 UDC2( $28.41 \pm 2.07$  mg/dL)군은 대조군에 비해 각각 8%와 17% 감소를 보였으나 유의적인 차이는 없었다.

콜레스테릴 에스테르 농도는 대조군( $131.73 \pm 10.28$  mg/dL)에 비해 유근피 에탄올 병합투여로 UDC1( $115.71 \pm 13.89$  mg/dL)군과 UDC2( $106.26 \pm 11.48$  mg/dL)군이 12%와 19%감하였으며, 특히 유근피 고용량 투여군에서 유의적인 차이가 있었다. 혈액 중 대부분의 콜레스테롤은 소장에서 흡수되어 80% 정도가 지단백의 지방산과 결합하여 콜레스테릴 에스테르 형태로 점막세포에 존재하고 나머지는 대부분 유리형으로 존재한다(94). 사람에게 있어서 총콜레스테롤에 대한 콜레스테릴 에스테르의 비는 약 70% 전후가 정상적이고 콜레스테릴 에스테르의 저하는 간질환 진단에 있어서 중요한 지표가 되며, 고콜레스테롤혈증일 때 상승되는 것으로 보고되었다(95).



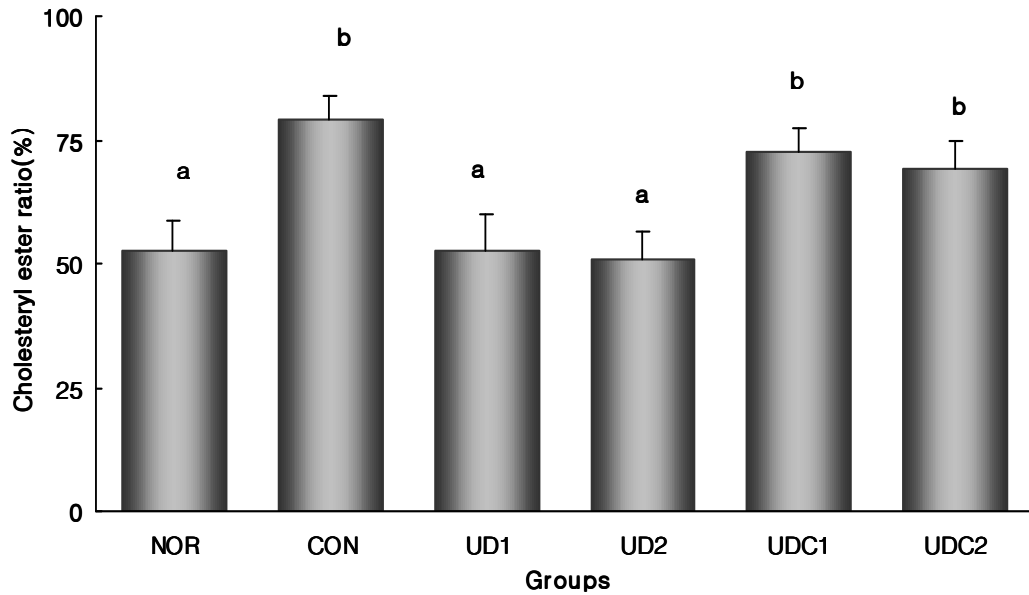
*Fig. 23. Contents of free cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 24. Contents of cholesteryl ester in the rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 25. Ratio of cholesteryl ester ratio in the rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

## 라. 혈청 중 LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 심혈관 위험지수(CRF) 및 동맥경화지수

유근피 에탄올추출물과 고콜레스테롤식이를 흰쥐에 6주간 급여시 혈청 중 LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤의 농도, 심혈관계위험지수와 동맥경화지수에 미치는 영향을 나타낸 결과는 Fig. 26~29와 같다.

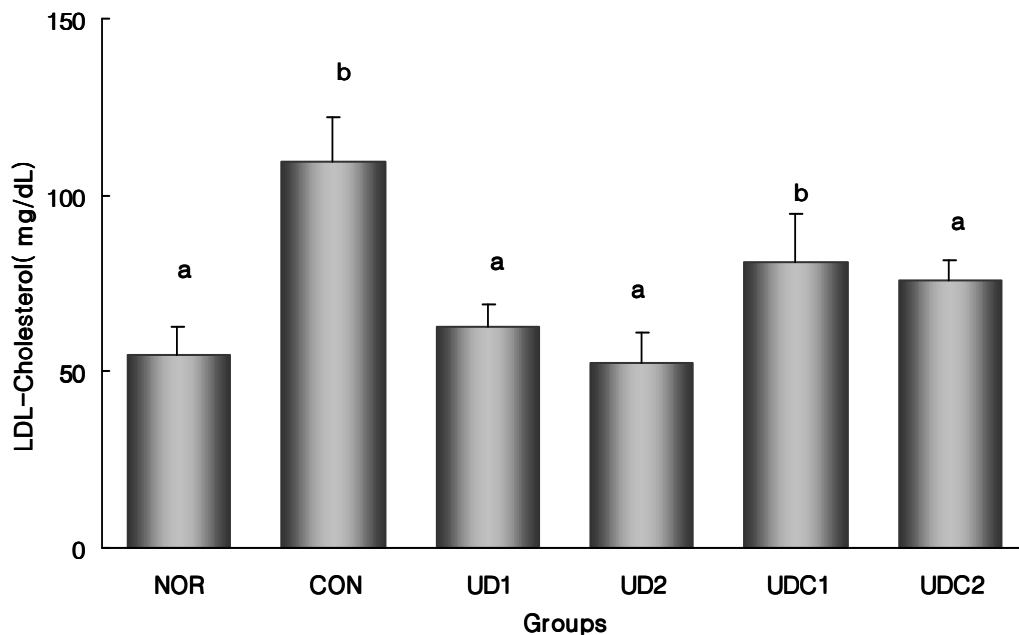
LDL-콜레스테롤의 농도를 측정된 결과 정상군  $54.55 \pm 5.12$  mg/dL에 비해 고콜레스테롤 식이 급여군인 대조군이  $109.71 \pm 11.52$  mg/dL로 49.7% 증가 하였으며, 유근피 에탄올 추출물을 병합 투여한 UDC1군과 UDC2군은 각각 34%와 31%로 유의적인 감소를 나타내었다. LDL은 세포의 수용체에 결합하여 간과 기타 조직에서 제거되는데, 유전적으로 LDL 수용체의 활성이 저하되면 식이 콜레스테롤에 의해 LDL 수용체의 활성이 저하되어 비결합 LDL이 혈 중으로 유출되어 혈청의 LDL 농도가 증가된다(96).

HDL-콜레스테롤의 농도는 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이를 급여한 대조군이 28% 감소하였고, 이는 고콜레스테롤 식이를 섭취한 동물에서는 정상 식이를 섭취한 동물보다 혈 중 콜레스테롤 농도가 증가하고 HDL-콜레스테롤 농도가 감소하는 것으로 보고와 일치 하였다.(97) 유근피 에탄올 추출물 병합투여로 UDC1군과 UDC2군에서 대조군에 비해 각각 15%와 22% 감소하였다. 특히 고용량 투여군에서 유의적인 감소를 보여, 용량 의존적 이었다. HDL 콜레스테롤은 말초 조직의 콜레스테롤을 간으로 역수송을 담당하고 있는 지단백질의 일종으로 Venter등(98)은 HDL-콜레스테롤 입자가 HDL-콜레스테롤을 에스테르화하는 LCAT(lecithin cholesterol acetyltransferase)의 활성화에 관여하여 콜레스테롤의 세포내 유입을 억제, 항동맥경화작용을 나타낸다고 보고한 것을 비롯하여

국내 여러 연구에서 HDL 콜레스테롤은 동맥경화와 혈관장애 개선에 대해 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(99). 유근피 에탄올추출물을 병합 투여함으로써 HDL-콜레스테롤 농도를 증가시키는 것은 유근피에 HDL-콜레스테롤 농도를 증가시키는 활성 작용이 존재하는 것으로 추측되며, HDL-콜레스테롤의 증가는 동맥경화의 진행을 억제 할 것으로 사료된다.

동맥경화지수와 심혈관위험 지수는 일반적으로 동맥경화 및 순환기계 질환의 발병의 위험도를 알리는 위험 지수로서 널리 이용되고 있다. 심혈관계지수(HDL-C/TC)은 정상군 2.71에 비해 대조군 6.25로 증가됨을 알 수 있었으며, LDL 콜레스테롤의 축적으로 인한 순환기계 질환의 발병율이 증가할 것으로 생각된다. 유근피 에탄올 추출물의 병합투여를 함으로써 UDC1 4.69와 UDC 23.97로 감소되었는데 이는 혈액내의 콜레스테롤 구성에 있어서 HDL 콜레스테롤의 농도를 증가시킴으로써 고지혈증으로 인한 순환기계질환의 위험성을 개선하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

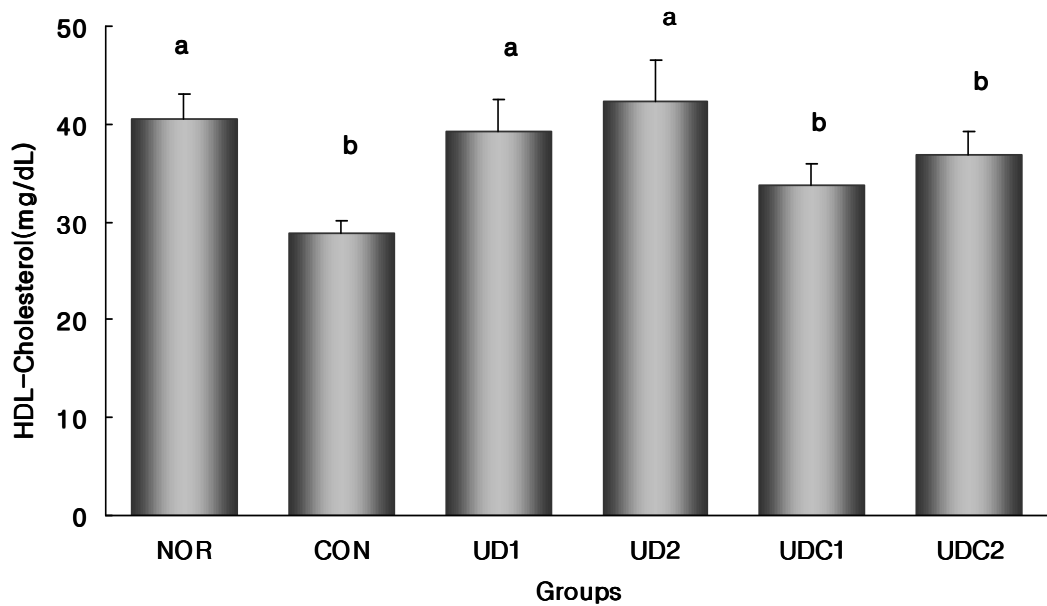
또한 동맥경화 발병 위험을 나타내는 동맥경화지수(AI)는 임상에서 3.0이상을 위험지수로 판단하고 있는데(100), 정상군(1.72)에 비해 대조군(4.75)에서 36.2%까지 현저하게 증가되어 식이 중 콜레스테롤의 증가에 의한 동맥경화의 위험성이 매우 증대된 상태임을 알 수 있었으며, 대조군에 비해 유근피 병합투여군인 UCD1(3.14)와 UDC2(2.65)는 대조군에 비하여 33.89%, 44.2%씩 감소하여 특히 고용량 투여군에서 유의적인 감소 효과를 볼 수 있었다. AI와 CRF는 순환기계 질환 발병율에 판단 지표로 임상에서 사용이 되는 중요 지표로서 유근피 에탄올 추출물의 병합투여가 AI와 CRF의 유의적 감소는 고지혈증 개선에 유용한 효과를 발휘한 것으로 생각된다.



*Fig. 26. Contents of LDL- cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with UDEE*

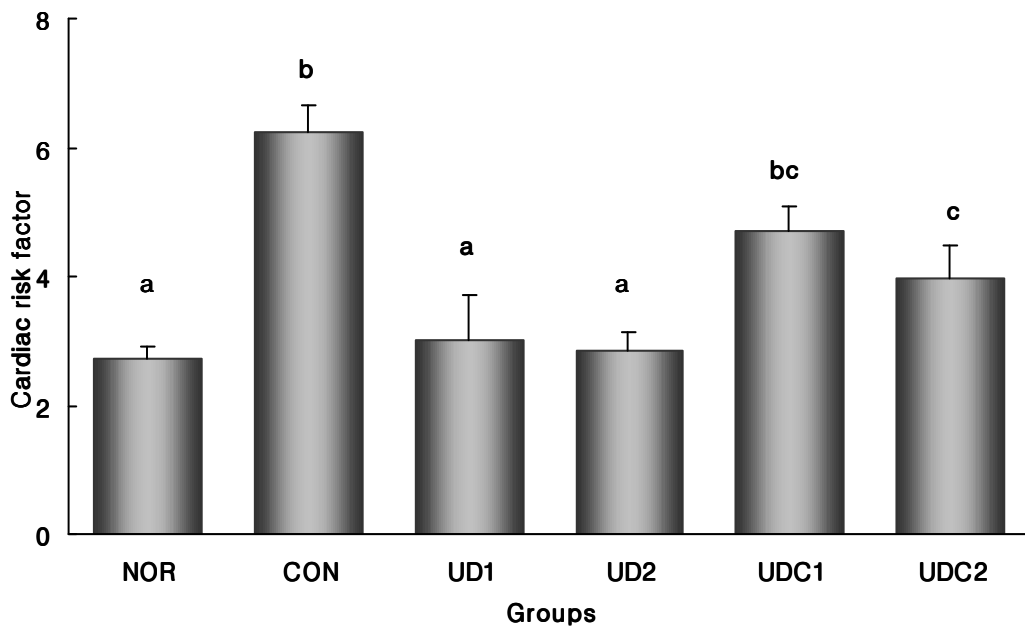
Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .





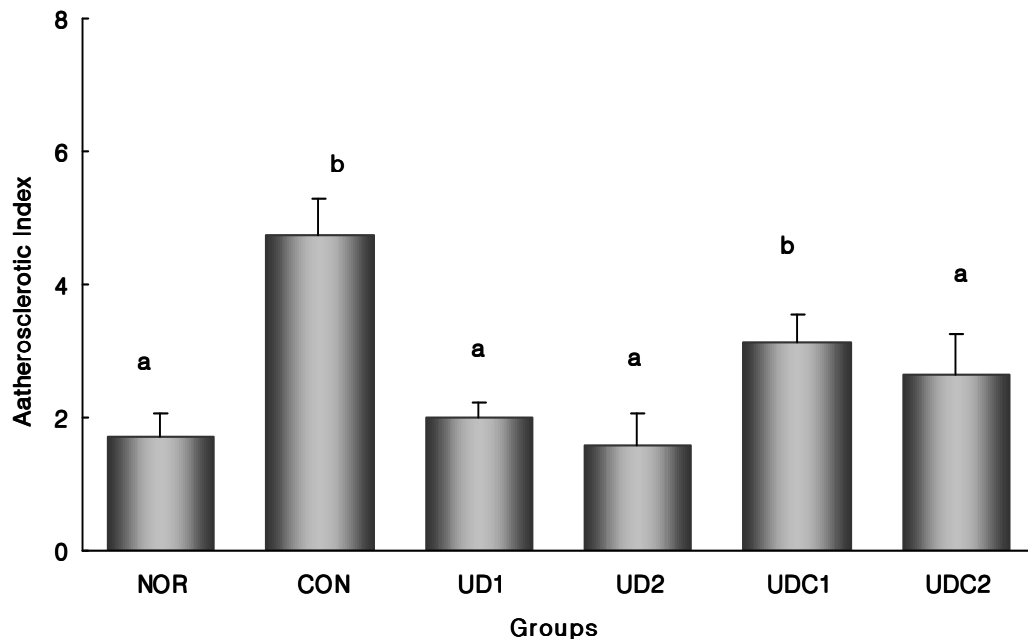
*Fig. 27. Contents of HDL- cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



**Fig. 28. Ratio of CRF in the rats fed high cholesterol diet with UDEE**

Abbreviations: Cardiac risk factor=HDL-cholesterol/total cholesterol. See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 29. AI of rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: AI(Atherosclerotic index) = (total chol. - HDL-chol.) / HDL-chol. See the legend of Table 12. Values are mean ± S. E of 10 rats per each group.

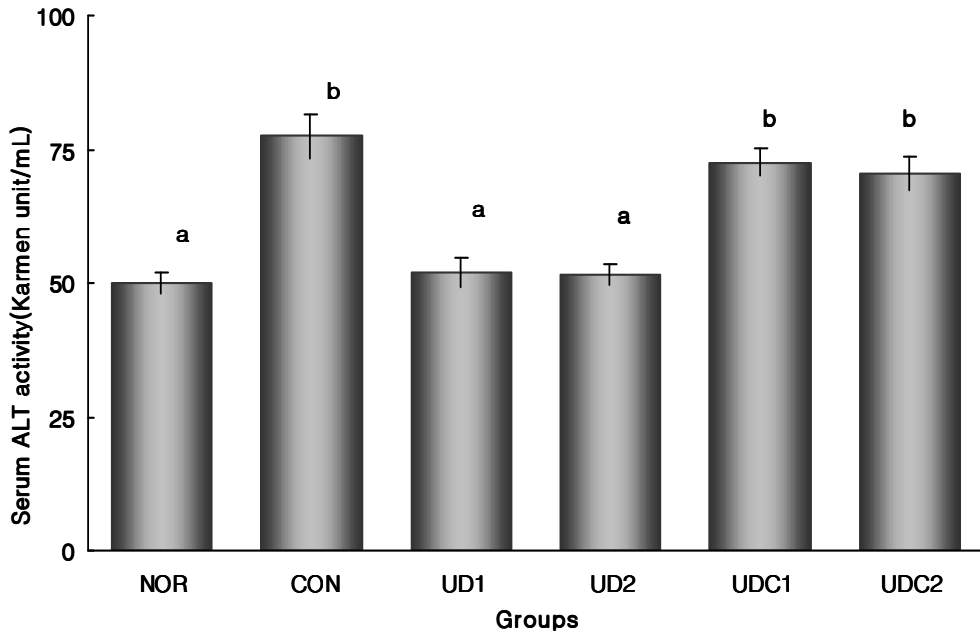
## 마. 혈청 중 ALT, AST 및 ALP활성

유근피 에탄올추출물을 고콜레스테롤식이를 급여한 흰쥐에 6주간 투여 시 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성을 측정한 결과는 Fig. 31~32와 같다.

혈청 중 AST 및 ALT활성은 알코올 대사 중 생성된 간손상 유발물질이 간대사에 작용하여 이상을 초래하고 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 간중 aminotransferase가 혈중으로 유출되어 혈장내에서 활성이 증가되는 것으로 보고되고 있다(101). AST의 경우, 콜레스테롤 혼합 식이만을 공급한 대조군( $152.85 \pm 13.63$  units)은 정상군( $113.36 \pm 9.59$  units)에 비하여 25% 유의적인 증가를 나타냈다. 유근피 에탄올의 병합 투여로 UDC1군( $145.37 \pm 9.45$  units)과, UDC2( $140.61 \pm 7.07$  units)군은 대조군에 비해 저하 되었다.

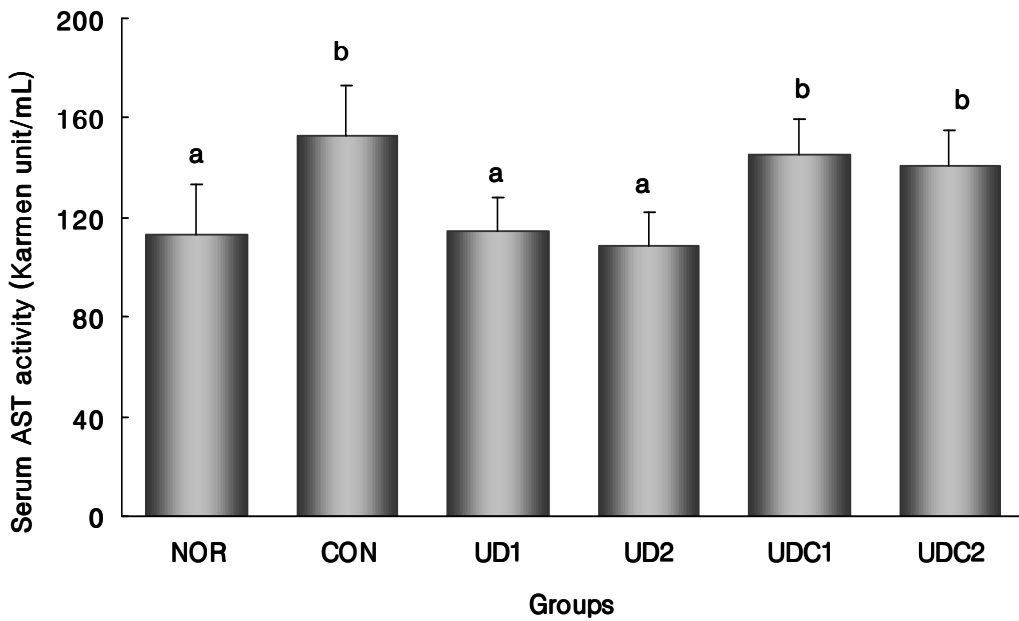
ALT의 경우, 대조군( $77.41 \pm 5.45$  units)은 정상군( $50.12 \pm 2.76$  units)에 비해 35.25% 유의적인 증가를 보였다. 유근피 에탄올 추출물 병합 투여로 대조군에 비해 감소는 되었으나 유의한 차이는 보이지 않았다.

ALP활성도 CON( $29.08 \pm 2.02$  units)군이 정상군( $20.24 \pm 2.49$  units)에 비해 31% 증가는 되었고, 유근피 에탄올의 병합 투여로 특히 고용량 투여군인 UDE2군에서 대조군에 비해 26.1% 감소하여 정상군에 가까운 수치를 나타냈다. 혈청 ALP는 담도계 폐색 또는 간질환 등에서 혈청치가 증가되는 것으로 급성 신부전증, 고지혈증, 폐경색증이 있을 때 간세포 장애가 고도로 진행되면 ALT, AST와 ALP 활성치가 동시에 높아지며 간장에서 담즙산 배설장애로 생겨 혈청 콜레스테롤 농도가 상승되는 것으로 알려져 있다(102).



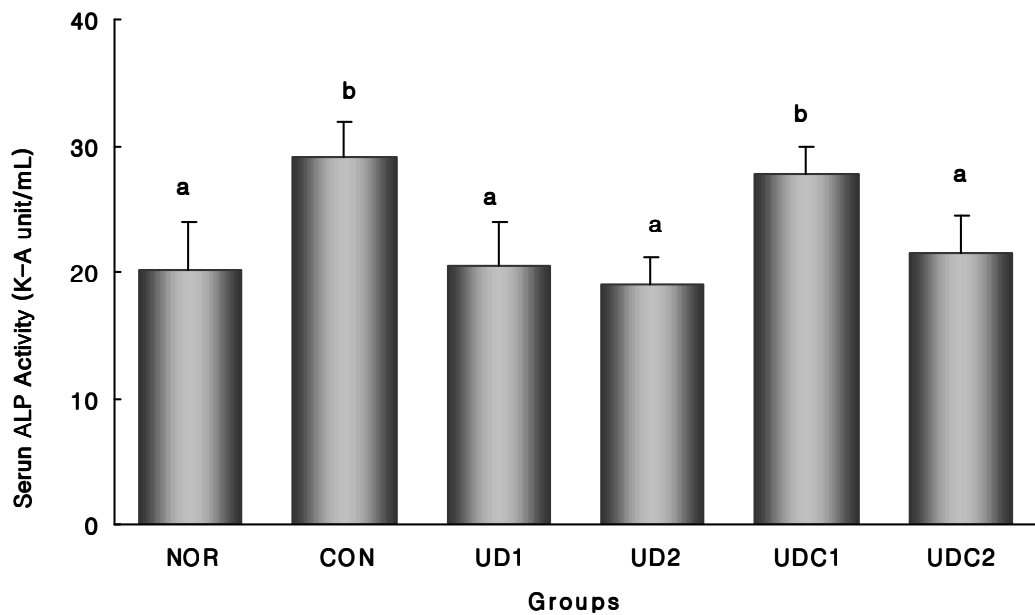
*Fig. 30. Activities of ALT in the serum of rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 31. Activities of AST in the serum of rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 32. Activities of ALP in the serum of rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

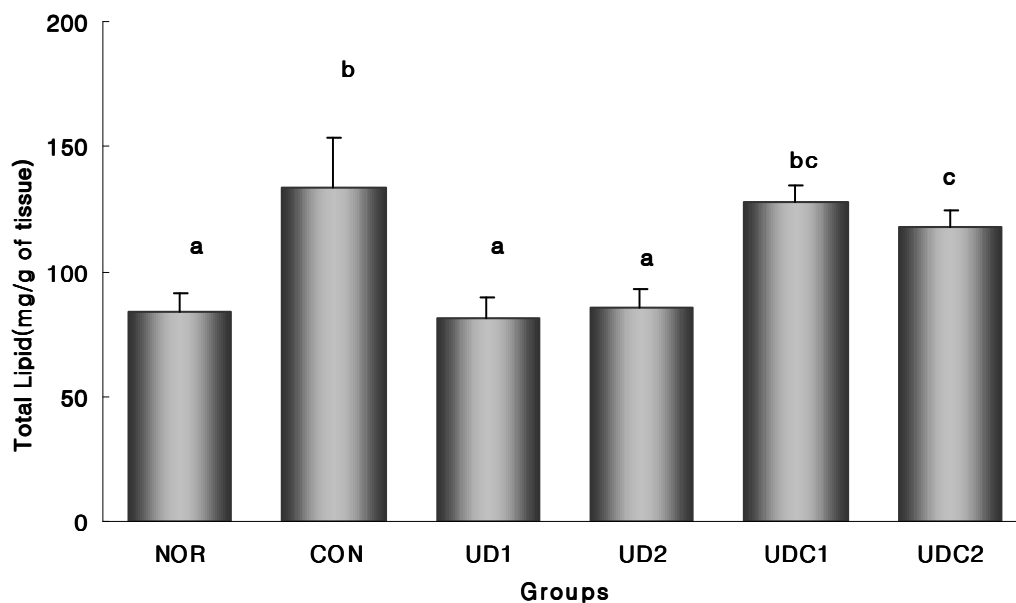
## 바. 간장 총 콜레스테롤 및 중성지질 농도

유근피 에탄올추출물과 고콜레스테롤식이를 흰쥐에 6주간 급여시 흰쥐의 간 중 총 지방량, 콜레스테롤과 중성지방의 함량은 Fig. 33~35와 같다.

간 중 콜레스테롤량의 경우 대조군은  $24.69 \pm 0.24$  mg/g으로 정상군의  $12.08 \pm 0.32$  mg/g에 비해 50% 유의적인 증가를 나타내었으며, 유근피 에탄올추출물 병합투여로 증가된 총 콜레스테롤량을 감소시켰으나 유의성은 없었다.

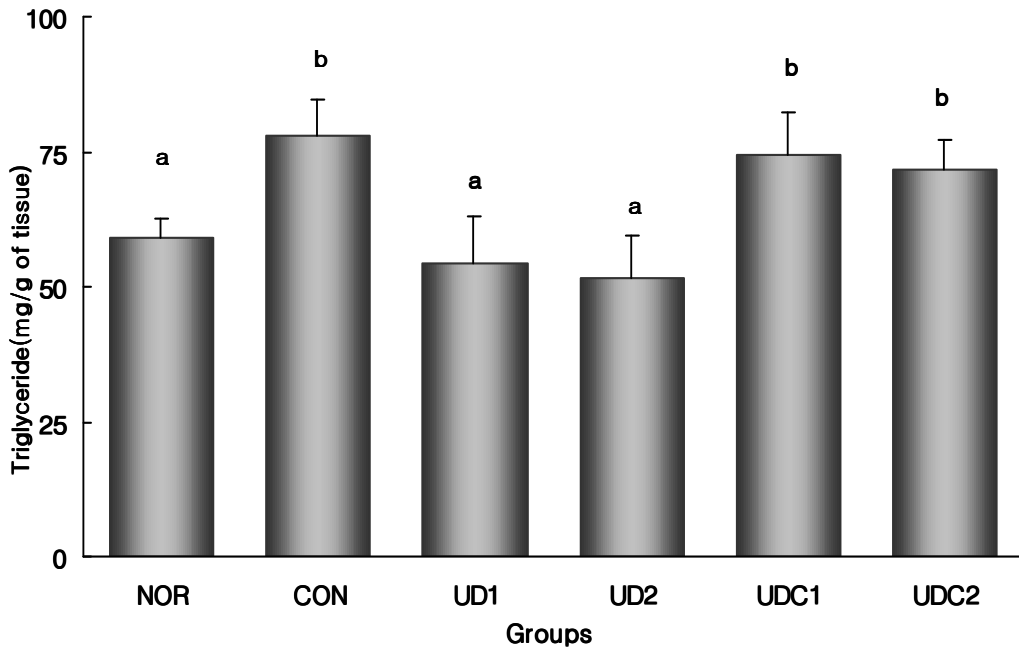
중성지방량은 정상군의  $58.96 \pm 4.05$  mg/g에 비해 대조군이  $77.94 \pm 6.34$  mg/g으로 24% 증가되었고, 유근피 에탄올추출물 병합투여로 간 중 중성지방량에는 변화가 없었다. 총 지질량은 정상군  $84.21 \pm 4.67$  mg/g로 고지혈증유발 식이만을 급여한 대조군이  $133.47 \pm 10.23$  mg/g로 63.13% 유의적 증가를 보였으며, 유근피 에탄올 병합투여로 변화는 없었다.





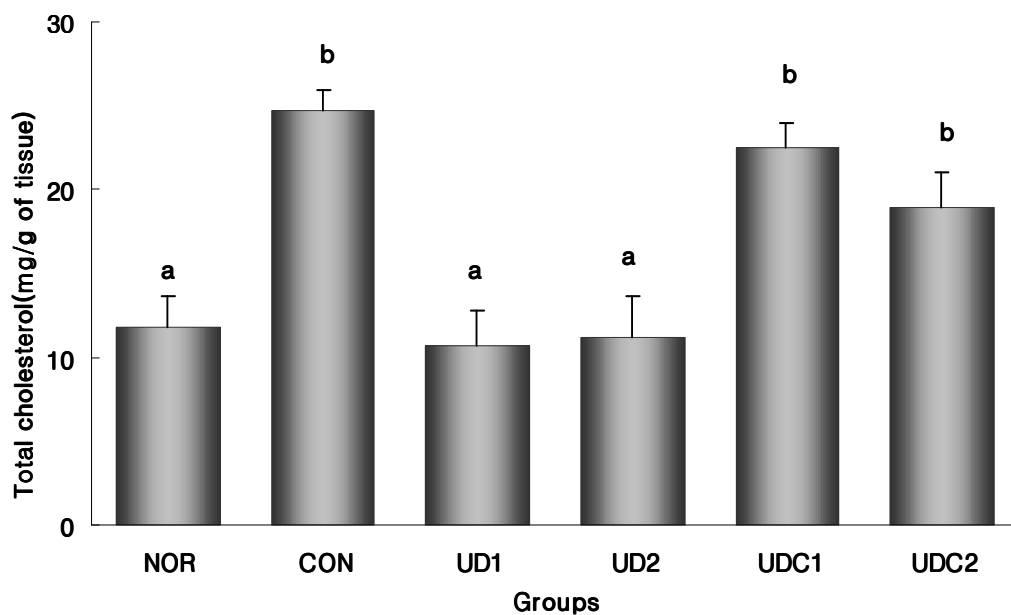
*Fig. 33. Contents of total-lipid in the liver of rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Turkey(T)-test.



*Fig. 34. Contents of triglyceride in the liver of rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .



*Fig. 35. Contents of total cholesterol in the liver of rats fed high cholesterol diet with UDEE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

## 제4장 요약

유근피의 생리활성 효과를 구명하기 위하여, 일반 및 영양성분 분석, *in vitro*에서 항산화력 측정, *in vivo*에서 에탄올에 의한 간의 산화적 세포손상에 작용하는 oxygen free radical의 소거 효과 및 콜레스테롤 식이로 유발된 고콜레스테롤혈증 억제 효능 등 생리활성 효과를 측정하여 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 유리당은 fructose, 아미노산은 aspartic acid, 지방산은 palmitic acid 및 유기산은 formic acid가 가장 많았고, 무기질은 Ca, 양이온은  $Ca^{++}$ 이 많았으며, 음이온은  $NO_3^-$ 가 검출되었다.
2. *In vitro*에서 유근피 에탄올추출물을 계통 분석하여 DPPH radical에 대한 자유기 소거능, Rancimat로 측정한 항산화지수, 아질산염 소거능, 지질과산화물 생성 억제와 linoleic acid에 대한 효과 등을 측정한 결과 분획 중 n-butanol의 항산화력이 가장 우수하였고 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 우수하였으며 과산화물가는 저장기간이 경과함에 따라 많은 증가를 나타내었다.
3. *In vivo*에서 알코올에 의한 간의 산화적 세포손상에 작용하는 oxygen free radical의 소거 효과에서,
  - ① 6주간의 체중 증가율과 식이효율은 대조군이 정상군에 비하여 현저히 감소되었으나 유근피 에탄올추출물과 알코올 병합투여군은 알코올투여로 감소된 체중을 정상군에 근접토록 유의하게 증가시켰으며 투여량에 따른 변화는 보이지 않았다.
  - ② 유리기 생성계인 xanthine oxidase(XO)활성은 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 증가되었고 유근피 에탄올추출물투여로 알코올 투여로 증가된 활성도를 감소시켰으나 유의하게 감소시켰다. 유리기 해독계 효소의 활성

도에서, SOD활성은 대조군이 정상군에 비하여 현저히 증가되었는데 이는 알코올투여로 생성된 활성산소(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 소거하려는 생리 적응 현상이었으며 유근피 에탄올추출물투여로 그 활성은 유의적으로 감소되었다. Catalase 활성은 알코올투여로 정상군에 비하여 많이 증가되었으나 유근피 에탄올추출물 투여로 증가된 활성을 유의적으로 감소시켰다. GSH-Px활성은 알코올 투여로 정상군에 비하여 증가되었으나 유근피 에탄올추출물투여로 증가된 활성을 유의적으로 감소시키지 못했다.

- ③ 간 조직 중 과산화지질 함량에서, 대조군의 TBARS량은 정상군에 비하여 유의성 있게 증가되었다. 한편 유근피 에탄올추출물 소량투여군은 알코올투여로 증가된 간 조직 중의 과산화지질 함량을 대조군에 비해 감소시켰으며 다량투여군의 경우 소량투여군에 비하여 더 감소하였다. GSH함량은 유근피 에탄올추출물만을 투여한 군은 정상군에 비하여 큰 변화를 나타내지 않았으나, 알코올 투여로 GSH함량은 정상군에 비하여 유의적으로 감소되었다. 그러나 유근피 에탄올추출물 다량투여군은 알코올 투여로 감소된 GSH함량을 정상군에 근접토록 증가시켰다.

4. *In vitro*에서 고지혈증 억제 효능 실험을 유근피 에탄올 추출물 분획물의 LDL 산화억제 효과를 비교한 결과 n-butanol에서 가장 높은 효과를 보였다.

5. *In vivo*에서 콜레스테롤 식이로 유발된 고콜레스테롤혈증 억제 효과에서,

- ① 고콜레스테롤식이만을 급여한 군은 정상군에 비하여 높은 체중증가율을 나타내었다. 유근피 에탄올추출물 투여로 대조군에 비하여 감소되는 경향을 나타내었으나 특히 유근피 에탄올추출물 다량투여군의 체중증가율이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다. 간장/체중 비율은 대조군에서 정상군에 비하여 유의하게 증가되었다.

- ② 유근피 에탄올추출물 투여시 고콜레스테롤식이 섭취로 증가된 AST활성이 감소되었으며, ALT 및 ALP 활성은 유근피 투여로 인한 유의한 차이

는 보이지 않았다.

- ③ 혈청 중 지질함량에서, 대조군은 정상군에 비하여 혈청 중 중성지질, 총콜레스테롤 함량이 유의성 있게 증가되었으나, 고콜레스테롤식이와 유근피 에탄올추출물을 병합투여의 경우 중성지질 함량은 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 총콜레스테롤 함량은 정상군보다 높았으나 고콜레스테롤식으로 증가된 콜레스테롤함량을 유의하게 감소시켰다. 또한 인지질 함량의 경우 고콜레스테롤식이 급여로 정상군에 비해 많은 감소를 나타냈으나 유근피 에탄올추출물 투여로 정상군에 근접하도록 증가되었다.
- ④ 혈청 중 유리콜레스테롤 및 콜레스테릴 에스테르함량에서, 유근피 에탄올추출물 투여군의 유리콜레스테롤 농도는 정상군에 비하여 감소의 경향을 나타냈으나 유의적인 효과는 아니었으며, 반면 콜레스테릴 에스테르 농도는 많은 감소를 나타냈다. 특히 유근피 에탄올추출물 다량투여군은 대조군에 비하여 약 36%정도 감소되었다.
- ⑤ 혈청 LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 HDL-C/TC비에서, 유근피 에탄올추출물 투여로 HDL-콜레스테롤농도가 대조군에 비하여 증가를 나타냈다. 동맥경화 발병 위험을 나타내는 동맥경화지수는 유근피 에탄올추출물 투여로 대조군에 비하여 다량투여군에서 79.80% 정도 감소되었다.
- ⑥ 간 중 총콜레스테롤량과 중성지방량은 고콜레스테롤식이 급여로 정상군에 비하여 증가되었으나 유의성 있는 변화는 나타내지 않았다.

이상의 실험결과에서 유근피의 항산화작용은 유리기 해독계 효소인 SOD, catalase 활성을 억제시키고 비효소적 항산화작용을 나타내는 GSH함량을 증가시킴으로서 지질과산화물에 대한 방어력이 증강되어 나타난 결과로 판단되어지며, 또한 고콜레스테롤 식이를 급여한 군에 비하여 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도 및 중성지질 농도 등은 감소시켰으며, HDL-콜레스테롤, 인지질 농도 등은 증가시킴으로써 지방간 및 동맥경화의 예방과 치료에 효과적일 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

1. Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Yosizumi S, Ninormiya N, Murakami N. 1997. Inhibitory effect on alcohol induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi* 117-108.
2. Fink A. 1996. Alcohol related problems in older persons: determinants, consequences and screening. *Arch Intern Med* 156: 1150-1156.
3. Watzel B, Watson PR. 1992. Role of alcohol abuse in nutritional immunosuppression. *J Nutr* 12(2): 2733-2737.
4. Linder MC. 1991. Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications. Elsevier, New York p. 79-83.
5. Choe M, Sin GJ, Choe GP, Do JH, Kim JD. 2003. Synergistic effects of extracts from Korean red ginseng, *Saururus chinensis*(Lour.) Baill. and *Rubus coreanus* Miq. on antioxidative activities in rats. *Korean J Medicinal Crop Sci* 11(2): 148-154.
6. Pryor WA. 1977. Free radical in biology. *In Involvement of radical reaction in aging and carcinogenesis in medicine chemistry. Elsevier Amsterdam* 331-361
7. Hur SK, Kim SS, Heo YH, Ahn SM, Lee BG, Lee SK. 2001. Effect of the grapevine shoot extract on free radical scavenger activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in raw macrophages. *J Applied Pharmac*. 9: 188-193.
8. Jae JU. 1989. Isolation and identification fo constituents from antioxidant and hematopoietic factions of panax gineseng C.A. Mayer. *phD Thesis*. Seoul University.
9. Sang D, Kim JH, Hoon IO. 1981. Antioxidant activity of panaxginseng

- browning products. *J Korean Agri Chem Soc* 24(3): 161-166.
10. Lim DK, Choi U, Shin DH. 1996. Antioxidative Activity of Some Solvent Extract from *Caesalpinia sappan* L. *Korean J Food Sci Tech* 28(1): 77-82.
  11. Trackshel GM, Maines MD. 1988. Characterization of glutathione S-transferase in rat kidney. *Biochem J* 252: 127-136.
  12. Simic MG. 1988. Mechanisms of inhibition of free radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 202: 377-386.
  13. Lin MY, Yen CL. 1999. Inhibition of lipid peroxidation by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum*. *J Agric Food Chem* 47: 3661-3664.
  14. Ito M, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, Sawada H. 2003. Antioxidative effects of lactic acid bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *J Agric Food Chem* 51: 4456-4460.
  15. Pokorny J. 1991. Natural antioxidant for food use. *Trends Food Sci Technol* 9: 223-227.
  16. Kim EJ, Ahn MS. 1993. Antioxidative effect of Ginger extracts. *Korean J Soc Food Sci* 9(1): 37-42.
  17. Lee CJ. 1999. A study on the antioxidative effects on the oils and identification of antioxidative substances from as *Astragalus membrabaceus* Bunge extracts. *Ph. d. dissertation*, Sungshin women's university
  18. Kim SY, Sohn CG, Chung WY. 2005. Effects of medical nutrition therapy on food habits and serum lipid levels of hypercholesterolemia patients. *J Korean Dietetic Associ* 11(1): 125-132.
  19. Levy RI. 1991. Cholesterol, lipoprotein, apoproteins and heart disease;



- present status and future prospects. *Clin Chem* 27: 653-657.
20. Lim SS and Lee JH. 1997. Effect *Atremisa Princeps* var *Orientalis* and *Cirsium japonicum* var *ussuiense* on serum lipid of hyperlipidemic rat. *Korean J Nutr* 30: 12-18.
  21. Gang MS, Lim SS and Lee, JH. 1997. A study on the chemical composition and hypocholesterolemic effect of *Nostoc commune*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 468-472.
  22. Sung IS, Kim MJ, Cho SY. 1997. Effect of *Quercus acutissima* Carruthers extracts on the lipid metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 327-331.
  23. Kang JA, Kang JS. 1997. Effect of garlic and onion on plasma and liver cholesterol and triglyceride and platelet aggregation in rats on basal or cholesterol supplemented diets. *Korean J Nutr* 32: 132-138.
  24. Kim JM, Choi MS, Cho JG, Jung YM, Park TW. 1994. Effect of *Euonymus alatus* and *Ulmus davidiana* var *japonica* on the immune system. *Korean J Vet Res* 34(2): 307-311
  25. Shin MK. 1977. Clinical traditional hergalogy. Younglimsa, Seoul Korea p669-778.
  26. Lee EB, Kim OK, Jung CS, Jung KH. 1995. The influence of methanol extract of *Ulmus davidiana* var. *japonica* cortex on gastric erosion and ulcer and paw edema in rat. *Korea J Pharmacol* 39: 671-675
  27. Hong ND, Roh YS, Kim NJ, Kim JS. 1990. A study on efficacy of *Ulmus* cortex. *Korean J Pharma* 1: 217-222.
  28. Yang Y, Hyun JW, Lim KH, Kim HJ, Woo ER, Park J. 1996. Antineoplastic effect of extracts from traditional medical plants and various plants(III). *Korea J Phama* 27: 105-110.

29. Yoon SM, Lee HG, Chun JH, Choi IK, Lee HD, Han JY, Lee JS. 2003. Two cases of acute hepatitis and renal failure after ingestion of the extract of elm bark in lung cancer patients. *The Korean Journal of Internal Medicine* 65(3): 829-831.
30. Bae YS, Kin JK. 2000. Extractives of the bark of ash and elm as medical hardwood tree species. *Mokjae Konhak* 28: 62-69
31. Lee MK, Sung SH, Lee HS, Cho JH, Kim YC. 2001. Lignan and neolignan glycosides from *Ulmus davidiana* var. japonica. *Arch Pharm Res* 24: 198-201.
32. Kim YS. 1991. Pharmacological studies of methanol extract of the cortex *Ulmus davidiana* var. japonica. *MS Thesis*. Ducsung University
33. 홍남두, 노영수, 김남재, 김진식. 1990. 유백피의 성분에 관한 연구. *생약학회지* 12(3): 201-204.
34. Eun JS, Song WY. 1994. The combined effects of n-BuoH fraction of Ulmi Cortex and anticancer drugs on cancer cell lines. *Korean J Pharma* 25(2): 144-152.
35. Shin DY, Kim HS, Min KH, Hyun SS, Kim SA, Huh H, Choi EC, Choi YH, Kim JW, Choi SH, Kim WB and Suh YG. 2000. Isolation of a potent anti MRSA sesquiteroenoid quinone from *Ulmus davidiana* var. japonica. *Chem Pharm Bull* 48(11): 1805-1806.
36. Jun CD, Pae HO, Kin TC, Jeong SJ, Yoo JC, Lee EJ, Choi BM, Cae SW, Park RK, chung HT. 1998. Inhibition of nitric oxide synthesis by butanol fraction of the methanol extract of *Ulmus davidiana* in murine macrophages. *J Ethnopharm* 62: 129-135.
37. Lee YJ, Han JP. 2000. Antioxidative activities and nitrite scavenging abilities of extracts from *Ulmus davidiana*. *J Korean Soc Fodd Sci*

- Nutr* 29: 893-899.
38. Kown YM, Lee JU, Lee MW. 2002. Phenolic compounds from barks of *Ulmus macrocarpa* and its antioxidative activities. *Korean J Pharma* 33: 404-410.
  39. A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis (16th Edition) Association of official analytical chemists. Washington, D.C.
  40. 우원식. 1997. 천연물 화학 연구, 서울: 서울대학교 출판부. p14-15.
  41. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1204.
  42. Chen CW, Ho CT. 1995. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *J Food Lipids* 2: 35-39.
  43. Kato H Lee, Chuyen, NV, Kim SB, Hayase F. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Biol Chem* 51: 1333-1338.
  44. Oswa T, M Namiki 1981. A novel type of antioxidative isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Biol Chem* 45: 735-739.
  45. Kim YJ, Kim CK, Kwon YJ. 1997. Isolation of antioxidative components of *Perilla semen*. *Korean J Food Sci Technol* 29: 38-43.
  46. Fujji H, Ohmachi T, Sagami I, Watanabe M. 1985. Liver microsomal drug metabolism in ethanol-treated hamsters. *Biochem Pharmacol* 34(21): 3881-3884.
  47. Downey JM, Miura Y, Eddy LJ, Chambers DE, Mellert T, Hearse DJ, Yellon DM. 1987. Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 19 :1053-1060.
  48. Crapo JD, McCord JM, Fridovich I. 1978. Preparation and assay of superoxide dismutase, *Methods enzymol.* ed. Fleischer S and Packer L.,

- Academic press, New York 53: 382-393.
49. Aebi H. 1974. Catalase, In *Methods of enzymetic analysis*, Bergmeyer HU, Bergmeyer, J and Grabi, M., eds. 3rd ed., Academic press, New York 2: 673-684.
  50. Flohe L, Wolfngng A, Gunzler WA. 1984. Assay of glutathione peroxidase. In *Methods Enzymol* 105: 114-130.
  51. Buege JA, Aust SD. 1978. The thiobarbituric acid assay. *Methods in enzymology* 52: 306-307.
  52. Tietze F. 1969. Enzymatic methods for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 27: 502-522.
  53. Lowry OH. Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
  54. Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic determination and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28: 56-63.
  55. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. 1985. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34: 1345-1353.
  56. Choe M, Kin HS. 2002. Effects of Korean wheat on LDL oxidation and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbit. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(1): 104-108.
  57. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR. 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 29: 538-542.
  58. Richmond W.1976. Use of cholesterol oxidase for assay of total and free

- cholesterol in serum by continuous flow analysis. *Clin Chem* 22: 1579-1588.
59. Eng LF, Noble EP. 1957. The maturation of rat brain myelin. *Lipids* 3: 157-162.
60. Noma A, Nakayama KN, Kota M, Okabe H. 1978. Simultaneous determination of serum cholesterol in high and low density lipoprotein with use of heparin,  $\text{Ca}^{2+}$  and an anion exchange resin. *Clin Chem* 24: 1504-1580.
61. Friedwald WT, Levy RL, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
62. Fiordaliso M, Kok N, Desager KP, Goethals F, Deboyser D. 1977. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma. *Am J Clin Nutr* 30: 170-176.
63. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
64. Zlatkis A, B Zak. 1969. Study of a new cholesterol reagent. *Anal Biochem* 29: 143-148.
65. Biggs HG, TM Erikson and WR Moorehead. 1975. A manual colirimetric assay of triglyceride in serum. *Clinical. Chem* 21: 437-441
66. Lee YJ. 2001. Antioxidative and antimicrobial activities of extracts from *Ulmus devidiana*. Catholic University of Taegu *pHD Thesis*.
67. Hwang JA. 1996. Study on werum concentrations of antioxidant minerals in healthy Korean adults. Yonsei University *MS Thesis*.
68. Lee KD, Chang HK, Kim HK. 1997. Antioxidative and nitrite scavenging

- activities of edible mushrooms. *Korean J Food Sci Technol* 29: 432-436.
69. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H. 1989. In Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press, I p223.
70. Harman D. 1982. In Free radicals in biology V. Academic Press New York p225-275.
71. Esquivel MM, Ribeiro MA, Bernardo-Gil MG. 1999. Supercritical extraction of savory oil; study of antioxidant activity and extract characterization. *J Supercritical Fluids* 14: 129-138.
72. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci. Technol* 27(6): 978-984.
73. Lee JH, Choi JS. 1993. Influence of some flavonoids on n-nitrosoproline formation in vitro and *in vivo*. *J Korean Soc Food Nutr* 22(3):266-272.
74. Paker L, Glazer AN. 1990. Oxygen radicals in biological systems. In methods in enzymology. *Oxygen radicals in biological systems*, Academic Press, London 186: 343.
75. Liber CS. 1994. Alcohol and the liver ;Update. *Gastroenterology* 106: 1085-1090.
76. Shaw S, Lieber, CS. 1983. Nutrition and alcohol, A clinical perspective, In : *Weininger J. Briggs GM, eds. Nutrition Update John Wiley & Sons*, New York 1: 79-104.
77. Mezey E. 1980. Alcoholics liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr* 33: 2709-2718.
78. Duke EJ, Joyce P, Ryan JP. 1973. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem J* 131(2): 187-190.
79. McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: An enzymatic function for

- erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244(22): 6049-6055.
80. Fritche K, Johnston PV. 1988. Rapid autooxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J Nutr* 118: 425-426.
  81. Bompart GJ, Prevot DS, Bascabds JL. 1990. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity *Clin Biochem* 23(6): 501-504.
  82. Plaa GL, Witscri H. 1976. Chemicals, drugs and lipid peroxidations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 16: 125-141.
  83. Speisky H, Kera Y, Penttila KE, Israel Y, Lindros KO. 1988. Depletion of hepatic glutathione by ethanol occurs independently of ethanol metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 12: 224-228.
  84. Lieber CS. 1991. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 15: 573-592.
  85. Vina J, Estrella JM, Guerro C, Romero FJ. 1980. Effects of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem J* 188: 549-552.
  86. Oh SI, Kim CI, Chun HJ, Park SC. 1998. Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J Nutr* 128: 758-763.
  87. Aykac G, Uysal M, Yalcin S, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. 1985. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicol* 36: 71-76.
  88. Lim SS, Kim MH, Lee JH. 1997. Effect of *Artemisia princeps* var *orientalis* and *Cirsium japonicum* var *ussuriense* on liver function body lipid and bile acid of hyperlipidemic rat. *J Korean Nutr Society* 30(7): 797-802.

89. Wursch P. 1979. Influence of tannin-rich Carob pod fiber on the cholesterol metabolism in the rat. *J Nutr* 109: 85-89.
90. Rhee SJ, Park HK. 1984. Changes of lipid content and histochemical observation in liver of rats fed high fat diet. *Korean J Nutr* 17(2): 113-125.
91. Rifkind BM. 1996. Diet, plasma cholesterol and coronary heart disease. *J Nutr* 116: 1578-1580.
92. Jang JY, Ldd MK, Kim MJ, Cho SY. 1998. Effect of fiber on serum lipid metabolism in rats with diet-induced cholesterolemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1211-1216.
93. Oda T, Shikata T, Natio C, Suzuki H, Kanetaka T. 1970. Phospholipid fatty liver: a report of three cases with a new type of fatty liver. *Jpn J Exp Med* 40: 127-140.
94. Goodman DS. 1964. The turnover of plasma cholesterol in man. *Physiol Rev* 45: 747-760.
95. Normura M, Nakajima Y, Abe H. 1992. Effects of long administration indigestible dextrin as soluble dietary fiber on lipid and glucose metabolism. *J Jan Food Nutr* 45(1): 21-25.
96. Steinberg D, Witztum JL. 1990. Lipoproteins and atherogenesis. *J Am A* 264: 3047-3052.
97. Cha JY, Cho YS, Yanagita T. 1999. Effect of cholesterol on hepatic phospholipid metabolism in rats fed a diet containing fish oil and beef tallow. *J Food Sci Nutr* 4(2): 125-129.
98. Venter CS, Vorster HH, Van der Nest DG. 1990. Comprison between physiological effects of konjac-glucomannan and propionate in baboons fed "western" diets. *J Nutr* 120: 1046-1050.



99. Steinberg D. 1983. Lipoproteins and atherosclerosis: a look back and look ahead. *Atherosclerosis* 3: 283-301.
100. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abborr RD, Kalousdian S, Kannel WB. 1986. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham study *JAMA* 256: 2835-2845.
101. Koo BY, Dhung JM, Lee HS. 1998. Biochemical Evaluation of Nutritional Status of Protein and Lipid in Patients with Alcoholic Liver Disease. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(6): 1236-1243.
102. Lim SS, Kim MH, Lee JH. 1997. Effect of *Artemisia princeps* var *orientalis* and *Cirsium japonicum* var *ussuriense* on liver function body lipid and bile acid of hyperlipidemic rat. *J Korean Nutr Society* 30(7): 797-802.