

## 감잎(*Diospyros kaki* Thunb) 추출물의 항산화 및 항알레르기 효과

유기환 · 정종문<sup>†</sup>  
수원대학교 생명과학과

### Antioxidative and Antiallergic Effect of Persimmon Leaf Extracts

Ki-Hwan Yoo and Jong-Moon Jeong<sup>†</sup>

Dept. of Life Science, The University of Suwon, Gyeonggi 445-743, Korea

#### Abstract

The purpose of this study was to investigate the antioxidative and antiallergic effects of persimmon leaf extract. Antioxidative and anti-inflammatory effects of the crude persimmon leaf extract (PLE) and the partially purified persimmon leaf extract (PPLE) were determined in *in vitro* assays by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and superoxide anion radicals, and 5-lipoxygenase (5-LO) and cyclooxygenase (COX). Total phenols and total flavonoid levels of PLE and PPLE were 230.0±19.6 mg/g and 475.5±38.7 mg/g, and 34.8±6.5 mg/g and 78.8±3.6 mg/g, respectively. DPPH and superoxide radical-scavenging activities (SC<sub>50</sub>) of the PLE and PPLE were 23.8±3.2 ppm and 10.0±1.3 ppm, and 47.6±3.4 ppm and 22.4±3.3 ppm, respectively. Inhibitory activities (IC<sub>50</sub>) of PLE and PPLE against 5-LO, COX-1 and COX-2 were 77.1±11.7, 38.6±7.0 ppm, 47.4±7.7, 25.3±6.3 ppm, and 129.5±5.5, 84.5±2.3 ppm, respectively. Moreover, two extracts inhibited dose-dependently NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, and also effectively inhibited the cutaneous anaphylaxis reaction activated by anti-dinitrophenyl IgE antibody in mice. These results suggest that PLE and PPLE may be useful for phytochemical materials for prevention and treatment of radical-mediated pathological and allergy diseases.

**Key words:** persimmon leaves, 5-lipoxygenase, cyclooxygenase, MTT assay, passive cutaneous anaphylaxis

#### 서 론

감나무(*Diospyros kaki* Thunb)는 오랜 역사를 가진 과실수로 온대 아시아 지방, 우리나라, 중국, 일본이 원산지이며, 우리나라의 중·북부 및 일부 산간 지방을 제외하고 전국에서 재배가 가능하다. 오랜 역사를 가진 과실수이지만 다른 과실에 비해 가공 이용 면에서는 뒤떨어진 과실수로서 근래에 들어서야 다각적인 측면에서 이용 가치가 연구되고 있는 실정이다. 과실인 감은 성숙 후에도 수렴작용과 혈관 수축작용이 뛰어난 것으로 알려진 tannin을 약 1~2%가량 함유하고 있고(1), 외국에서 수입되는 오렌지 등과 같은 과실보다 비타민 A와 C가 풍부하며 여러 생리활성 효능을 갖고 있어 전통적으로 애용되어 온 과실이다(2). 기능성 페놀화합물이 다량 함유되어 있으며, 이들 물질은 항산화기능, 노화방지, 심혈관계 질환 예방 및 항암효과가 보고되어 있다(3-5). 더구나 감잎은 녹차 이상의 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며, 예로부터 천식이나 고혈압 같은 여러 질병을 치료하는데 효과가 있는 것으로 알려져 민간요법으로 많이 이용되어 왔다. 이의 임상학적 약리 작용과 효

능은 여러 고문헌에 잘 나타나 있지만, 감잎의 성분과 그 효과에 관한 연구는 최근에서야 이루어지고 있는 실정이다. 감잎의 성분으로는 tannin, polyphenol류, 수지, coumarin류 화합물, betulinic acid, oleanolic acid, ursolic acid와 같은 유기산 및 엽록소, astragaloside, myricitrin과 같은 flavonoid 배당체, 비타민 A, C를 과량 함유하고 있으며 비타민 B<sub>1</sub>, 판토텐산, 엽산의 함유량이 많은 것으로 보고되고 있다(6).

인간의 질병 및 노화는 대사과정 중 발생하는 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitric oxide(NO·), nitrogen dioxide(NO<sub>2</sub>·), hydroxyl(OH·), peroxy(ROO·), alkoxy(RO·), hydroperoxy(HO<sub>2</sub>·) radical 등의 산화반응에 기인하며, 이런 radical들은 체내 지질, 단백질, 그리고 핵산과 같은 물질의 손상을 유발한다(7,8). 우수한 항산화력과 낮은 가격 때문에 널리 사용되고 있는 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT)와 butylated hydroxyanisole(BHA)은 과량 섭취 시 심각한 병을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다(9). 따라서 보다 안전하고 효력이 강한 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 감잎의 항산화 기능을 나타내는 폴리페놀류는 지질과산화 억제작용(10), 산패 억제작용(11), 항암작용(12)

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr  
Phone: 82-31-222-6514, Fax: 82-31-222-6552

등이 보고되어 있으며, 항산화능이 좋다고 알려진 녹차보다 원료의 수급이 훨씬 더 수월한 장점을 지닌다.

알레르기성 비염과 아토피와 같은 제 I 형 알레르기 반응 (type I allergic reaction)은 생체 내 결합조직, 피부, 호흡기 등에 분포하는 비만세포가 면역글로불린 E(IgE)에 의해 탈과립이 유도되면서 나타난다(11). 비만세포 내에 있는 5-리폭시게나제(5-lipoxygenase, 5-LO)와 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)는 arachidonic acid를 변형하여 염증을 유발하는 류코트리엔류(leukotrienes)와 프로스타글란딘류(prostaglandins)를 생성한다(12). LO는 현재까지 type 5-, 8-, 9-, 11-, 12- 그리고 type 15-LO 등 다양한 종류가 알려져 있으며 특히 포유동물에서 5-LO에 의해 생성된 류코트리엔류는 제 I 형 알레르기 증상 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(13-16). COX는 COX-1과 COX-2의 두 종류가 존재하며, COX-1은 위, 신장을 비롯한 여러 조직에서 발현되며 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적 생체기능에 작용하고, COX-2는 염증성 자극에 의해 단시간에 유도되는 발현 현상을 나타낸다(17-19). 따라서 이러한 물질들이 기도 내로 유입되면 염증세포를 활성화시키고 기도 점막에서 점액분비를 촉진시켜 알레르기 반응이 일어나게 된다(20). 또한, 호산구를 비롯한 염증세포의 조직 내 침윤은 제 I 형 알레르기 반응이 잠복기를 거친 후기 반응에 발생하는 현상으로 만성적인 코막힘이나 비 특이적 점막 과민성을 일으킨다. 따라서 프로스타글란딘류와 류코트리엔류의 합성, 히스타민 방출 그리고 호산구의 비강 내 침윤에 대하여 억제 활성을 갖는 물질들은 제 I 형 알레르기 예방 및 치료제로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

현재까지 감잎의 연구는 감잎 추출물의 항산화 효과에 관련된 연구는 많이 진행되어 있으나 감잎 추출물의 항알레르기 관련 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 감잎의 항산화 효과와 항알레르기 효능을 확인하고 추출물의 활성을 높이기 위하여 비 특이적 흡착 resin인 HP-2MG를 사용하여 부분정제를 실시하였다. 감잎 추출물의 생리활성을 측정하기 위하여 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼, superoxide 음이온 라디칼 소거능을 측정하고, 항알레르기 효능을 측정하기 위하여 알레르기 관련 염증 매개 물질인 류코트리엔류와 프로스타글란딘류를 생성하는 5-LO와 COX의 억제능을 측정하였다. 또한 LPS(lipopolysaccharide)로 염증을 유도시킨 RAW 264.7 세포에서 세포가 방출하는 NO 생성량의 변화를 조사하여 항염증성 기능의 유무와 정도, 그리고 수동피부아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 억제효능을 측정하여 건강기능성 식품 원료로서의 유용성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 5-lipoxygenase

(5-LO), arachidonic acid, N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine(TMPD), promethazain hydrochloride, hematin, sulfanilamide, N-(1-naphthyl)ethylenediamide, anti-dinitrophenyl(DNP) IgE, DNP-albumin, 그리고 epigallocatechin gallate(EGCG)는 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. Cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2는 Cayman사(Ann Arbor, USA)에서 구입하였다. UV-VIS 흡광계는 Spectronic Genesys 5(Milton Roy Co., Ivyland, USA)모델, ELISA autoreader는 VERSA max(Molecular devices Co., Sunnyvale, USA)모델을 사용하였다. 추출기와 반응조는 Extraction Water Bath와 일반 반응조(CHOJALAB사, 화성시, 한국)를 사용하였다. 추출에 이용된 감잎은 한약 건재상에서 구입하였다. 감잎 추출물 정제는 Diaion HP-2MG resin(Mitsubishi Chemical Co., Minato-ku, 일본)을 사용하였다. 그 이외의 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

### 추출 및 정제

감잎과 60% 에탄올을 1:7의 무게 비율로 추출기에 넣고 30°C에서 2시간 교반 추출하였다. 2시간 후 추출물을 여과지(Whatman No. 2)를 사용하여 여과한 후 60°C에서 감압농축(Rotavapor rotary evaporators, Büchi Co., Flawil, Switzerland)하여 분말 상태로 준비하고 이를 PLE(Persimmon Leaves Extract)라 명하였다. 또한 PLE의 폴리페놀 함량을 높이기 위하여 부분 정제를 실시하였다. 액상의 감잎 추출물을 증류수로 10배 희석하여 에탄올의 농도를 6%로 조정하고 비 특이적 흡착 resin인 HP-2MG와 2시간 동안 반응조를 이용하여 교반시켰다. 2시간 뒤 상등액을 제거한 후 80% 에탄올을 이용하여 흡착 resin에 흡착된 물질을 elution 하였다. 이것을 여과지(Whatman No. 2)를 사용하여 여과한 후 60°C에서 감압농축 하여 분말 상태로 준비하여 PPLE(Partially Purified Persimmon Leaves Extract)라 명하고, 그 외 실험에 사용하였다.

### 실험동물과 관리

ICR계 생쥐(수컷, 7주령)는 (주)오리엔트 바이오(경기도 가평)에서 구입하여 본 실험실의 사육실에서 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 사육실 온도는  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $55 \pm 5\%$  및 명암은 12시간 주기로 자동 조절하였다.

### 세포배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 서울 아산병원(서울특별시 송파구)에서 분양받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 총 페놀성 화합물 함량

총 페놀성 화합물의 함량은 Gutfinger(21)의 방법을 변형

하여 측정하였다. 즉, 시료 1 mL에 2%(w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 1 mL를 가하여 3분간 상온에서 반응시킨 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 첨가하여 30분간 상온에서 반응시켰다. 이 반응물 1 mL를 취하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준농도 곡선은 EGCG(epigallocatechin gallate)를 이용하여 작성하였다.

#### 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 다음과 같은 방법으로 측정하였다(22). 시료 0.5 mL에 95% 에탄올 1.5 mL, 10%(w/v) 염화알루미늄용액 0.1 mL, 1 M 초산칼륨용액 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 가하여 충분히 교반을 하고 실온에서 30분간 방치한다. 그 후 증류수를 대조액으로 하여 반응액을 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준농도 곡선은 quercetin을 이용하여 작성하였다.

#### DPPH 라디칼 포착 효능 측정

PLE와 PPLE에 대한 DPPH 라디칼 포착능을 확인하기 위하여 Yasushi 등(23)의 문헌을 변형하여 실험하였다.  $2.0 \times 10^{-4}$  M 농도가 되도록 에탄올에 용해한 DPPH를 1.5 mL, 시료 0.15 mL, 증류수 1.35 mL를 첨가하여 30분 동안 25°C에서 반응시킨 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 포착능(%)은  $100 - [(시료를 첨가한 반응군의 흡광도 / 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도) \times 100]$  식으로부터 구하였다. 그 결과는 50% scavenging activity concentration(SC<sub>50</sub>) 값으로 나타내었고, 양성대조군으로 녹차카테킨인 EGCG와 항산화제로 알려진 비타민 C를 사용하였다.

#### Superoxide 음이온 라디칼 포착 효능 측정

PLE와 PPLE에 대한 superoxide 음이온 라디칼 포착효능 측정은 SOD 활성 검출 kit를 사용하였다. 시료 0.05 mL, 발색액(0.4 mM xanthine, 0.24 mM nitro blue tetrazolium in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0) 0.5 mL, 효소액(0.048 unit/mL xanthine oxidase in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0) 0.5 mL를 첨가하고 잘 혼합하여 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후, 반응정지액(70 mM sodium dodecyl sulfate) 1 mL를 첨가하여 효소 반응을 정지시킨 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide 음이온 라디칼 포착능(%)은  $100 - [(시료를 첨가한 반응군의 흡광도 / 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도) \times 100]$  식으로부터 구하였다. 그 결과는 50% scavenging activity concentration(SC<sub>50</sub>) 값으로 나타내었고, 양성대조군으로 녹차카테킨인 EGCG와 항산화제로 알려진 비타민 C를 사용하였다.

#### 5-LO 억제 효능 측정

PLE와 PPLE에 대한 5-LO 억제 효능 측정은 lipoxigenase inhibitor screening assay kit를 이용하여 실험하였다. 샘플 10 µL에 5-LO(220 units/mL) 90 µL와 1 mM linoleic acid 10 µL를 첨가하여 5분간 상온에서 반응시킨 후,

색원체(chromogen) 100 µL를 가하여 상온에서 5분 동안 반응시키고 ELISA reader 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 50% inhibitory concentration(IC<sub>50</sub>) 값으로 나타내었고 양성대조군으로 녹차카테킨인 EGCG를 사용하였다. 5-LO 억제율(%)은  $[(대조군의 흡광도 - 실험군의 흡광도) / 대조군의 흡광도] \times 100$  식을 이용하여 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었다.

#### COX 억제효능 측정

PLE와 PPLE에 대한 COX 억제효능은 Reddy 등(24)의 방법을 변형하여 수행하였다. 96 well plate에 한 well당 60 units/mL의 COX-1이나 30 units/mL의 COX-2를 40 µL씩 넣고, 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 90 µL, 30 µM EDTA 20 µL, 150 µM hematin 20 µL 그리고 시료 20 µL를 혼합하여 25°C에서 5분간 반응시키고 5 mM TMPD 5 µL와 20 mM 아라키돈산 5 µL를 첨가하여 25°C에서 5분간 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. COX 억제율(%)은 다음과 같은 식을 이용하여 50% inhibitory concentration(IC<sub>50</sub>) 값으로 나타내었으며 양성대조군으로 녹차카테킨인 EGCG를 사용하였다. COX 억제율(%) =  $[(대조군의 흡광도 - 실험군의 흡광도) / 대조군의 흡광도] \times 100$

#### MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정

PLE와 PPLE의 세포에 대한 독성 측정은 MTT [(3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma, MO, USA)] 측정으로 분석하였다. 이 방법은 MTT가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것으로, DMEM 배지를 이용하여 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 동안 전 배양하였다. 24시간 후 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 PLE와 PPLE를 DMSO에 녹인 뒤 DMSO의 최종농도가 1%가 되도록 배지로 희석하여 추출물의 농도별(0, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL)로 각각 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 5시간과 24시간 동안 각각 처리하였다. 처리 후 well 당 0.2% MTT용액을 20 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 상등액을 모두 제거하고 DMSO 150 µL씩을 첨가하고 10분간 상온에서 생성된 formazan을 모두 녹이고 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. DMSO에 대한 영향을 알아보기 위해 일반 대조군과 1% DMSO에 대한 대조군으로 나누어 실험하였으며, 세포 생존율(%)은 다음과 같은 식을 사용하여 나타내었다. 세포 생존율(%) =  $(\text{샘플처리군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$

#### Nitric oxide 소거능 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess 반응을 이용하여 측정하는 것으로 대체하였다. DMEM 배지를 이용

하여 96 well culture plate에  $1 \times 10^4$  cells/well의 RAW 264.7 세포를 분주 후 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 24시간 전 배양하였다. 24시간 후, 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 PLE와 PPLE를 DMSO에 녹인 뒤 DMSO의 최종농도가 1%가 되도록 배지로 희석하여 추출물의 농도별(0, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL)로 1시간 동안 처리하였다. 1시간 후 100 ng/mL의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 동안 생성된 NO는 Griess시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 전체 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도로 측정하였는데, 세포배양 상층액 50 µL와 Griess시약[1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 50 µL를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 녹차카테킨인 EGCG를 사용하였으며, 표준농도 곡선은 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 이용하여 얻었다. Nitric oxide 소거능(%)은 다음과 같은 식으로 구하였다. Nitric oxide 소거능(%)=100-[시료를 첨가한 반응군의 흡광도/ 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도]×100]

#### 수동피부아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 억제 반응 측정

PLE와 PPLE에 대하여 수동피부아나필락시스 반응 억제 효능을 알아보기 위하여 Kim 등의 방법(25)을 이용하여 실험하였다. ICR 수컷 마우스 양쪽 귀에 anti-DNP IgE(1 µg/mL)를 10 µL씩 주사하고 47시간 경과 후, PLE 혹은 PPLE를 경구 투여하였다. 한 시간 뒤(즉, anti-DNP IgE 주사 48시간 경과 후) DNP-albumin 0.25 mg과 Evans blue 1.25 mg을 용해한 생리식염수 0.25 mL를 꼬리정맥에 주사하여 반응을 일으켰다. 30분 후 경추 탈골하여 치사시킨 다음 양쪽 귀를 제거한 후 제거한 양쪽 귀에 1 N KOH 1mL씩을 넣고 37°C shaking incubator에서 12시간 교반하였다. 교반이 끝난 뒤 0.6 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>와 acetone을 5:13으로 혼합하여 4 mL 첨가하였다. 이것을 3000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액속의 양쪽 귀 혈관으로부터 누출된 Evans blue 색소량을 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수동피부아나필락시스의 억제율(%)은  $[1 - (\text{샘플처리군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도})] \times 100$ 의 식으로 나타냈으며 양성대조군으로 녹차카테킨인 EGCG와 프로메타진 하이드로클로라이드(promethazine hydrochloride, Phenergan®: H1 histamine receptor antagonist)를 사용하였다.

#### 통계분석

실험결과는 3회 반복하여 평균±표준오차(mean±SEM)로 나타냈으며, Student's t-test에 의해 유의성을 검정하여 p<0.05인 결과를 얻었을 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### 총 페놀성 화합물 함량 및 플라보노이드 함량 측정 결과

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성질이 있기 때문에 페놀의 함량이 증가할수록 항 돌연변이, 콜레스테롤 저하작용, 항암 및 항산화작용 등의 다양한 생리활성 기능이 증가된다(26,27). 또한, 플라보노이드는 식물에 널리 존재하는 노란색 계열의 색소를 나타내는 약 4000여개의 화합물로 항산화작용, 순환기계 질환의 예방, 항염증, 항알레르기, 항균, 항바이러스, 지질저하작용, 면역증강작용, 모세혈관강화 작용 등이 보고된 바 있다(28,29). 페놀성 화합물 및 플라보노이드 함량 측정에는 각각 단일물질인 epigallocatechin gallate(EGCG)와 quercetin을 사용하여 표준곡선을 작성하였다. EGCG는 비만세포의 염증반응 부위로의 이동을 억제하며, 티로신키나아제(tyrosine kinase)의 인산화반응을 저해하여 비만세포의 탈과립화를 억제한다. 또한 EGCG는 알레르기성 반응에 관여하는 히스타민(histamine), 류코트리엔류(leukotrienes), 사이토카인(cytokine)의 생성을 억제한다고 보고되었다(30, 31). 그리고 항산화에도 관여하여 EGCG의 페놀성 OH기가 수소원자의 공여에 의해 radical 연쇄반응을 정지시킨다. 비타민 C는 대표적인 수용성 천연항산화제로 수용성계에서 생성된 radical을 포착 소거하는 능력이 매우 강력한 것으로 알려져 있다. 따라서 이후에 이루어진 항알레르기 및 항산화 실험에서도 EGCG와 비타민 C를 양성대조군으로 사용하였다.

PLE와 PPLE부터 총 페놀성 화합물과 플라보노이드 함량을 측정하였다. 측정결과 Table 1에서와 같이 PLE는 230.0±19.6 mg/g의 페놀성 화합물과 34.8±6.5 mg/g의 플라보노이드를 함유하고, PPLE는 475.5±38.7 mg/g의 페놀성 화합물과 78.8±3.6 mg/g의 플라보노이드를 함유하는 것으로 나타났다. 일반적인 추출방법에 비해 흡착성 resin에 의해 정제되었을 때 페놀성 화합물은 약 2배, 플라보노이드는 약 2.2배 증가됨을 확인할 수 있었다. Hong 등(32)이 발표한 감잎의 메탄올 추출물의 페놀성 화합물 315.90±57.4 mg/g, 플라보노이드 43.64±3.9 mg/g보다 PPLE가 각각 약 1.5배, 1.8배 높은 결과를 보였는데, 이는 추출용매의 차이에서 비롯된 것으로 생각된다.

Table 1. Content of total phenolics and flavonoid in PLE and PPLE (mg/g)

	Total phenolics <sup>1)</sup>	Total flavonoid <sup>2)</sup>
PLE	230.0±19.6	34.8±6.5
PPLE	475.5±38.7	78.8±3.6

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

<sup>1)</sup>A standard compound was epigallocatechin gallate (EGCG) for total phenolics assay.

<sup>2)</sup>A standard compound was quercetin for total flavonoid assay.

**Table 2. DPPH radical scavenging effects of PLE and PPLE**

DPPH radical scavenging activities SC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)	
PLE	23.8±3.2
PPLE	10.0±1.3
EGCG	4.4±0.4
Vitamin C	2.0±0.3

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

<sup>1)</sup>SC<sub>50</sub>: 50% scavenging concentration.

**DPPH 라디칼 포착 효능 측정 결과**

DPPH법은 안정한 자유라디칼인 DPPH가 수소공여체(H-donor)와 반응하는 능력을 바탕으로 측정하는 것이다. DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼로서, 항산화 물질에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화능을 측정할 때 DPPH 라디칼 포착능 측정법이 많이 이용된다. DPPH 라디칼 포착 효능 측정결과를 Table 2에 나타내었다. PLE와 PPLE의 SC<sub>50</sub>값은 각각 24.8±3.2 ppm, 10.0±1.3 ppm이며, 양성대조군으로 사용된 EGCG와 비타민 C의 SC<sub>50</sub>값은 각각 2.0±0.3 ppm, 4.4±0.4 ppm으로 나타났다. PLE보다 PPLE의 DPPH 라디칼 포착 효능이 증가함으로써 페놀성 화합물이 증가할수록 DPPH 라디칼 소거능이 비례적으로 증가하는 많은 연구들과 동일한 결과를 나타내었다(32-34).

**Superoxide 음이온 라디칼 포착 효능 측정 결과**

Superoxide 음이온 라디칼 포착효능 측정은 xanthine과 xanthine oxidase를 반응시킨 후 nitroblue tetrazolium (NBT)으로 발색하여 측정하였다. Superoxide 음이온 라디칼 포착 효능 측정 결과를 Table 3에서 정리한 바와 같이 PLE와 PPLE의 SC<sub>50</sub>값은 47.6±3.4 ppm, 22.4±3.3 ppm이며, 양성대조군으로 사용한 EGCG와 비타민 C의 SC<sub>50</sub>값은 각각 5.8±0.2 ppm, 0.7±0.1 ppm으로 나타났다. 이는 PPLE

**Table 3. Superoxide anion radical scavenging effects PLE and PPLE**

Superoxide anion radical scavenging activities SC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)	
PLE	77.1±11.7
PPLE	38.6±7.0
EGCG	18.9±5.5
Vitamin C	0.7±0.1

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

<sup>1)</sup>SC<sub>50</sub>: 50% scavenging concentration.

**Table 4. Inhibitory effect of PLE and PPLE against 5-lipoxygenase and cyclooxygenase type 1, 2**

	IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)			Ratio of COX-2 IC <sub>50</sub> /COX-1 IC <sub>50</sub>
	5-LO	COX-1	COX-2	
PLE	77.1±11.7	47.4±7.7	129.5±5.5	2.7
PPLE	38.6±7.0	25.3±6.3	84.5±2.3	3.3
EGCG	18.9±5.5	9.3±0.4	13.3±2.0	1.4

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

<sup>1)</sup>IC<sub>50</sub>: 50% inhibitory concentration.

가 순수 정제물인 EGCG에 비하여 약 3.8배 떨어지는 효과를 보였으나 순수 정제물이 아닌 부분 정제물임을 생각할 때 PPLE의 높은 효능을 보여준다.

**5-LO 억제 효능 측정 결과**

5-LO는 arachidonic acid를 기질로 하여 류코트리엔류를 생성하는데, 류코트리엔이 과도하게 생성될 경우 아토피, 알레르기성 비염, 천식과 같은 다양한 염증 및 알레르기 질환의 원인이 된다(35). PLE와 PPLE의 5-LO억제효능을 측정 한 결과 Table 4와 같이 각각 IC<sub>50</sub>값이 77.1±11.7 ppm, 38.6±7.0 ppm으로 나타났고, 양성대조군으로 사용한 EGCG의 경우 18.9±5.5 ppm으로 나타났다. PLE와 PPLE의 5-LO 억제 효능이 단일물질인 EGCG의 효능에 비교하면 약 4배와 2배 정도 떨어지지만 이전의 연구결과에서 항염증효과가 있음이 알려져 있는 자근, 대추와 같은 천연물의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 195.1 ppm, 206.9 ppm인(36) 것과 비교했을 때 PLE와 PPLE가 5-LO를 상당히 효과적으로 저해한다고 할 수 있다.

**COX 억제효능 측정 결과**

COX는 두 가지 종류로 구분되어 있다. 프로스타글란딘류는 constitutive cyclooxygenase(COX-1)와 inducible cyclooxygenase(COX-2)에 의해 arachidonic acid로부터 생성된다. COX-1은 일정하게 발현되어 위장, 신장, 혈소판 및 혈관 등의 조직에서 생리적인 항상성을 유지하는 등 정상적 생체기능을 유지하도록 하지만, COX-2는 염증 자극원에 의해 염증성 세포에서 유도되며, 염증 및 알레르기 반응을 매개하는 프로스타글란딘류를 형성한다(20). PLE에 대하여 COX억제 효능을 측정한 결과, Table 4와 같이 COX-1과 COX-2의 IC<sub>50</sub>값은 47.4±4.4 ppm, 129.5±5.9이며, PPLE의 IC<sub>50</sub>값은 각각 25.3±6.4 ppm, 84.5±2.3 ppm으로 나타났고 양성대조군인 EGCG의 경우 COX-1과 COX-2의 IC<sub>50</sub>값은 각각 9.3±0.4 ppm, 13.3±2.0 ppm으로 나타났다. PLE와 PPLE에 대한 COX-1의 IC<sub>50</sub>값은 양성대조군인 EGCG보다 각각 약 5배, 2.7배씩 떨어지는 양상을 보였다. 따라서 PLE와 PPLE는 COX-1의 높은 억제로 인한 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

COX-2에 대한 선택적 저해능을 COX-1의 IC<sub>50</sub>값과 COX-2의 IC<sub>50</sub>값의 비로 나타내었을 때 감잎 추출물, PPLE 그리고 EGCG가 각각 2.7, 3.3, 1.4로 나타났다. 이는 이전의 연구결과(34)에서 항알레르기 효능이 우수한 식물소재로 알려져

있는 첨차 추출분말보다는 PLE와 PPLE의 COX-2 IC<sub>50</sub>/COX-1 IC<sub>50</sub>의 비가 각각 약 2.3배(6.3/2.7), 1.9배(6.3/3.3) 떨어지는 것으로 나타나 첨차 추출분말보다 더 선택적으로 COX-2를 억제하는 것으로 나타났다.

#### MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정 결과

마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대한 PLE와 PPLE의 정상세포 보호 및 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다(Fig. 1). PLE와 PPLE을 농도별(0, 50, 100, 250, 1000 µg/mL)로 5시간 및 24시간 동안 각각 처리한 결과, 5시간 처리군에서는 PLE와 PPLE, 그리고 추출물의 용매로 사용된 1% DMSO의 대조군 모두에서 세포독성을 보이지 않았고, PLE와 PPLE은 오히려 생존율이 증가함에 따라서 세포의 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 24시간 처리군에서는 추출물의 용매로 사용된 1% DMSO의 대조군의 생존율이 약 81.3%로 나타났으며, PLE가 1000 µg/mL의 농도에서 약 30.0%의 생존율을 보였고



**Fig. 1.** Effect of PLE (A) and PPLE (B) on the cell viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 50, 100, 250, 500, and 1000 µg/mL) of PLE and PPLE for 5 hr and 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. All data were represented as mean ± SEM of three independent experiments. \*Significantly different from control group at  $p < 0.05$ .

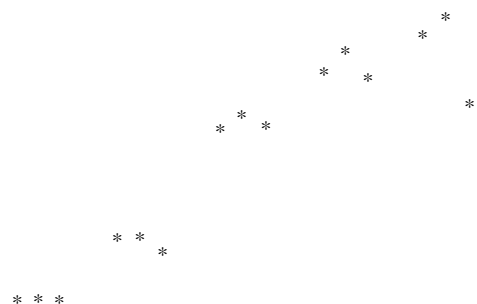
그 이하의 농도에서는 독성이 나타나지 않았다. PPLE는 실험에 사용된 모든 농도에서 독성을 보이지 않았다. 따라서 PLE는 5시간 처리군의 실험에 사용된 모든 농도와 24시간 처리군의 500 µg/mL 농도 이하 농도에서는 생존율에 영향을 주지 않았으며, PPLE 경우 5시간과 24시간 처리군의 실험에 사용된 모든 농도의 범위에서 세포의 생존율에 영향을 주지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

#### Nitric oxide 소거능 측정 결과

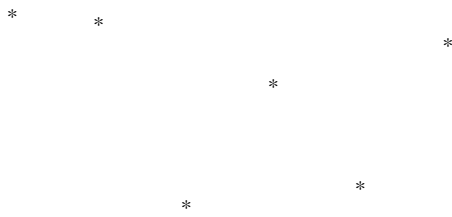
염증 부위의 활성화된 대식세포는 prostaglandin(PG)과 nitric oxide(NO) 등을 대량으로 생성함으로써 염증 매개에 큰 역할을 한다. NO는 다양한 생리 및 병리학적 활성을 나타내어 조직 내의 염증반응에 일정한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO는 arginine으로부터 constitutive nitric oxide synthase(cNOS) 혹은 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 생성되며, 특히 iNOS는 LPS, cytokine과 같은 자극에 의해 급격하게 유도되어 과량의 NO를 생성하여 염증반응에 관여한다. 또한 생성된 NO는 superoxide 음이온(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 쉽게 반응하여 매우 반응성이 높고 독성이 강한 산화제인 peroxynitrite(ONOO<sup>-</sup>)를 생성한다. Peroxynitrite는 단백질 및 지질의 과산화를 유도하고 세포독성을 일으키는 것으로 알려져 있다. PLE와 PPLE의 NO 소거능 측정 결과 SC<sub>50</sub>값이 186.5 ± 8.6 ppm과 185.5 ± 12.0 ppm으로 양성대조군으로 사용된 EGCG의 SC<sub>50</sub>값(191.35 ± 43.9 ppm)보다 낮게 나타나 NO의 소거에 상당한 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

#### 수동피부아나필락시스(passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 억제 효능 측정 결과

수동피부아나필락시스 반응은 IgE 관련 작용기전에 의해



**Fig. 2.** Effect of PLE, PPLE and EGCG (positive control) on the nitric oxide scavenging activities of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (0, 50, 100, 250, 500, and 1000 µg/mL) of PLE, PPLE, or EGCG (positive control) for 1 hr. All data were represented as mean ± SEM of three independent experiments. \*Significantly different from control group at  $p < 0.05$ .



**Fig. 3.** Inhibitory effect of PLE and PPLE on the DNP-albumin induced passive cutaneous anaphylaxis. DNP-albumin was administered 30 min prior to the challenge with Evans blue. Each group of mice were orally administered with promethazine hydrochloride (1 mg/kg), EGCG (10 mg/kg), PLE (10, 50 mg/kg), or PPLE (10, 50 mg/kg) 1 hr before the tail vein injection of DNP-albumin with Evans blue. All data were represented as mean±SEM of three independent experiments. \*Significantly different from control group at p<0.05.

비만세포로부터 히스타민, 프로스타글란딘류, 류코트리엔류 등과 같은 화학 매개물질의 작용으로 혈관 벽 세포의 간격이 확장됨에 따라 투과성이 증가, 마우스의 조직으로 청색 색소인 Evans blue가 누출된다. 이때 IgE 매개 PCA에 대한 억제 작용이 있는 물질은 색소의 조직으로의 누출을 억제하여 대조군에 비하여 누출된 색소량이 적어진다. 따라서 vehicle만을 투여한 대조군에 비해 양성 대조군으로 사용된 EGCG(10 mg/kg)와 프로메타진 하이드로클로라이드(1 mg/kg)의 경우 각각 49.8%, 51.9%의 억제효과를 보였다. PLE는 10, 50 mg/kg의 농도에서 각각 22.5%, 22.7%의 억제율을 보여 농도 의존적이지 않는 결과를 보였으며, PPLE은 10, 50 mg/kg의 농도에서 각각 40.4%, 50.2%의 억제율을 보여 PLE보다 약 2배가량 우수한 효과를 보였으며 더구나 동일 농도(10 mg/kg)에서 EGCG와 거의 차이가 없는 결과를 보였다(Fig. 3). 이는 PLE와 PPLE가 *in vivo*에서 혈관에서 조직으로 색소 누출을 억제하는 것으로 미루어 IgE로 매개되는 피부 알레르기에 효과가 있음을 나타낸다.

**요 약**

본 연구에서는 현재까지 연구되어진 감잎 추출물(PLE)의 추출방법을 달리하고 그 추출물을 비 특이적 흡착 resin을 사용하여 부분 정제함으로써 추출물의 활성을 높이고자 하였으며 PLE와 PLE의 부분 정제물(PPLE)의 폐놀성 화합물 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 또한 이들의 항산화제와 항알레르기 개선제로써의 유효성을 알아보기 위해 항산화 효과에 관여하는 DPPH 라디칼 포착효능, superoxide 음이온 라디칼 포착효능과 제 I 형 알레르기 반응 억제 효능에

관여하는 5-LO억제 효능, COX억제효능, NO소거효능 및 수동피부아나필락시스 억제 효능(PCA)을 측정하였다. 그 결과 PLE와 PPLE의 폐놀성 화합물은 각각 230.0±19.6 mg/g, 475±38.7 mg/g이 함유되어 있었고, 플라보노이드는 각각 34.8±6.5 mg/g, 78.8±3.6 mg/g 함유되어 있는 것으로 나타났다. 그리고 PLE와 PPLE이 각각 23.8±63.2 mg/g, 10.0±1.3 mg/g의 농도에서 DPPH 라디칼을, 47.6±3.4 ppm, 22.4±3.3 ppm의 농도에서 superoxide 음이온 라디칼을 50% 소거하는 것으로 나타났다. PLE와 PPLE의 항알레르기 효능에 관하여 5-LO의 IC<sub>50</sub>값이 각각 77.1±11.7 ppm, 38.6±7.0 ppm으로 양성대조군인 EGCG의 IC<sub>50</sub>(18.9±5.5 ppm)보다는 높았지만 PLE와 PPLE가 EGCG와 같은 단일 물질이 아니라 천연혼합물임을 감안하였을 때 5-LO를 비교적 낮은 농도에서 억제하고 있다고 볼 수 있다. 또한, COX-2의 선택적 저해율을 COX-1과 COX-2의 비율 비교를 통해 나타낸 결과 양성대조군으로 사용한 EGCG보다는 떨어지는 결과를 나타냈으나 다른 천연물과 비교하였을 때 COX-2를 상당히 선택적으로 저해하고 있음을 확인하였다. 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포주를 사용하여 낮은 세포독성과 NO소거에도 우수한 효과가 있음을 확인하였고, 마우스를 이용하여 수동피부아나필락시스 반응 억제 효과도 확인하였다. 이상의 결과에 따르면, 감잎 추출물이 항산화 및 항알레르기 효능을 갖고 있어 알레르기성 비염이나 아토피와 같은 알레르기관련 질병 예방 및 개선 또는 건강식품 원료로서 유효하게 사용될 것이라 생각된다.

**문 헌**

1. Mutsuo T, Ito S, Ben-Arie R. 1991. A model experiment for elucidating the mechanism of astringency removal in persimmon fruit using respiration inhibitors. *J Jpn Soc Hort Sci* 60: 437-442.
2. Yu TJ. 1976. *Food carte*. Pak Myoung Publishing Co., Seoul, Korea. p 129-132.
3. Moon SH, Kim KH, Park KY. 1996. Antitumor effect of persimmon leaves *in vivo* using sarcoma-180 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 865-870.
4. Ma J, Liu XY, Noh KH, Kim MJ, Song YS. 2007. Protective effects of persimmon leaf and fruit extracts against acute ethanol-induced hepatotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 12: 202-208.
5. Kim ES, Kim MK. 1999. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of persimmon, green tea and pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 32: 337-352.
6. Moon SH, Park KY. 1995. Antimutagenic effects of boiled water extract and tannin from persimmon leaves. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 880-886.
7. Block G. 1993. Vitamin C, cancer and aging. *Age* 16: 55-58.
8. Feskanich D, Ziegler RG, Michaud DS, Giovannucci EL, Speizer FE, Willett WC, Colditz GA. 2000. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst* 92: 1812-1823.

9. Seog HM, Seo MS, Kim HM, Ahn MS, Lee YT. 2002. Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Korean J Food Sci Technol* 34: 889-892.
10. Dushkin MI, Zykov AA, Pivovarov EN. 1993. The effects of natural polyphenol compounds on the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Bull Eksp Bio Med* 116: 393-395.
11. Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Agata I, Arichi S. 1984. Studies on the activities of tannins and related compounds: V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Planta Med* 50: 473-477.
12. Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Komori A, Sueoka E, Sueoka N, Kozu T, Sakai Y. 1996. Japanese green tea as a cancer preventive in humans. *Nutr Rev* 54: S67-70.
13. Kemal C, Louis-Flamberg P, Krupinski-Olsen R, Shorter AL. 1987. Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: a possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry* 26: 7064-7072.
14. Nakatsuka M, Osawa Y. 1983. Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1630-1640.
15. Neichi T, Koshihara Y, Murota S. 1983. Inhibitory effect of esculetin on 5-lipoxygenase and leukotriene biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 753: 130-132.
16. Sekiya K, Okuda H, Arichi S. 1982. Selective inhibition of platelet lipoxygenase by esculetin. *Biochim Biophys Acta* 713: 68-72.
17. Otto JC, Smith WL. 1994. The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 269: 19868-19875.
18. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, De Witt DL, Smith WL. 1995. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270: 10902-10908.
19. Yokoyama C, Takai T, Tanabe T. 1988. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett* 231: 347-351.
20. Jew SS, Bae ON, Chung JH. 2003. Anti-inflammatory effects of asiaticoside on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 cell line. *J Toxicol Pub Health* 19: 33-37.
21. Gutfinger T. 1981. Polyphenol in olive oils. *JAOCs* 58: 966-972.
22. Kim EJ, Lee HJ, Kim HJ, Nam HS, Lee MK, Kim HY, Lee JH, Kang YS, Lee JO, Kim HY. 2005. Comparison of colorimetric methods for the determination of flavonoid in propolis extract product. *Korean J Food Sci Technol* 37: 918-921.
23. Yasushi S, Tsukase N, Keiko S, Hiroe Y, Hisashi Y. 1999. Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and model compound. *Chem Pharm Bull* 47: 1369-1374.
24. Reddy CM, Bhat VB, Kiranmai G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. 2000. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoerythrin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 599-603.
25. Kim YR, Choi SH, Kim KM. 1994. Anti-allergic and anti-inflammatory actions of *Cimicifuga heracleifolia*: partial purification of active compounds. *J Appl Pharmacol* 2: 149-154.
26. Lee KD, Kim JS, Bae JO, Yoon HS. 1992. Antioxidative effectiveness of water extract and ether in wormwood (*Artemisia montana* pampan). *J Korean Soc Food Nutr* 21: 17-22.
27. Jeong HJ, Park SB, Kim S, Kim HK. 2007. Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitiscoignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1491-1496.
28. Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K. 1997. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and pseudomonas. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 102-104.
29. Cha JY, Kim SY, Jeong SJ, Cho YS. 1999. Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. *Korean J Life Science* 9: 389-394.
30. Nishikawa H, Kitani S. 2008. Tea catechins have dual effect on mast cell degranulation induced by compound 48/80. *Int Immunopharmacol* 8: 1207-1215.
31. Yamamoto MM, Inagaki N, Kitaura J, Chikumoto T, Kawahara H, Kawakami Y, Sano M, Miyase T, Tachibana H, Nagai H, Kawakami T. 2004. O-Methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. *J Immunol* 172: 4486-4492.
32. Hong JH, Kim HJ, Choi YH, Lee IS. 2008. Physiological activities of dried persimmon, fresh persimmon and persimmon leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 957-964.
33. Kwak CS, Kim SA, Lee MS. 2005. The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1143-1150.
34. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 723-727.
35. Lee HJ, Ryu JH. 2000. Screening of leukotriene B4 receptor antagonist activity from the herbal drugs. *Kor J Pharmacogn* 31: 273-279.
35. Kim KM. 1996. Screening of anti-allergic agents using lipoxygenase assay and degranulation marker. *J Drug Research C.N.U* 5: 45-48.
36. Kim KB, Lee EG, Chai OH, Song CH, Jeong JM. 2007. Inhibitory effects of phyto-extract mixture (PEM381) on type I allergic reaction. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 155-162.

(2009년 8월 20일 접수; 2009년 9월 29일 채택)