

GA 0565-05056

국산 홍화로부터 골강화 성분의 추출 및
활성성분의 가공기술개발

Development of Osteo-Active Supplement from
Korean *Carthamus tinctorius* Extract

연구 기관

한국 식품 연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국산 홍화로부터 골강화 성분의 추출 및 활성성분의
가공기술개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 10 월 13 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 김인호 선임연구원

세부연구책임자 : 김은미 선임연구원, 이창호 선임연구원

참 여 연 구 원 : 성기승 책임기술원, 한대석 책임연구원, 김영언 선임연구원
김지현 연구원, 정낙희 연구원

협동연구기관명 : 경원대학교

협동연구책임자 : 황귀서 교수

참 여 연 구 원 : 이대영 연구원, 이한신 연구원, 한재웅 연구원

요 약 문

I. 제 목

국산 홍화로부터 골강화 성분의 추출 및 활성성분의 가공기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

골관계 질환은 남녀 모두에게 생리적으로 hormone의 변화와 함께 필연적으로 찾아오는 자연노화 현상이다. 전인구의 10%에 이르는 노인 인구는 골관계 질환 대상이며 평균수명 연장, 스트레스, 운동부족 등으로 장년부터 질환이 발생하는 것을 감안하면 환자 수는 현재 약 300만에서 날로 증가하고 있다. 노인 사망 원인의 10% 이상을 차지하는 골관계 질환은 완전한 치료수단이 개발되어 있지 않으며 대중적인 요법만이 있다. 홍화(Safflower, *Carthamus tinctorius* L.)는 한국, 중국, 일본 등에서 오랜 역사를 가지고 재배하여 온 약용 식물로서 통경제, 어혈제 및 골강화에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 골강화에 관하여는 국내에서 특히 관심도가 높아 중국산 등 외산이 시장에 동시에 유통되고 있다. 그러나 홍화의 뼈질환 예방 및 치료 효과는 민간구전으로 알려졌을뿐 과학적이고 구체적으로 알려진 내용은 없다. 또한 골강화 활성에 관여하는 성분이 밝혀져 있지 않아 활성성분을 활용한 기술과 제품보다는 단순추출 제품만이 시중에 유통되고 있다. 현재 화학적 치료제가 부분적 완화만 보완할뿐 부작용의 동반 등 근본적인 치료에는 한계를 보이고 있는점을 감안하면 홍화는 예방소재로서 연구의의가 있는것으로 고려된다. 홍화 재배 농가는 뼈에 이로운 효능 확인, 활성성분의 실체, 활성성분의 추출조건, 추출물의 가공기술 등을 필요로 하고 있다. 따라서 국산 국내 3,000억, 국외 100억불에

이르는 골강화 예방 및 치료 시장에 참여하고 국산 홍화의 우수성을 입증하여 부작용없는 골강화 제품의 기초를 확립하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 국산 홍화의 골강화 활성 검증
 - 가. 세포계 골강화 활성 시스템 구축
 - 나. 동물계 골강화 활성 시스템 구축
 - 다. 홍화의 골강화 활성 검색
2. 홍화 골강화 성분의 구명 및 추출조건 설정
 - 가. 골강화 성분의 이화학적 특성 구명
 - 나. 활성성분의 분획 및 정제 및 구성성분 구명
 - 다. 활성성분의 추출 및 조건 설정
3. 홍화 골 강화 활성 물질의 안정성 확보 및 소재화
 - 가. 활성 추출물의 안정성 시험
 - 나. 활성물질의 소재화 개발
 - 다. 골강화 건강 시작품을 위한 기초확립

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구결과 요약

홍화의 골강화 기능을 세포계와 동물실험계로 평가 하였다. 홍화의 골세포증식효과는 인간유사세포계를 이용하여 비교하였으며 골 활성의 지표로서 Alkaline phosphatase(ALP) 활성은 대조구 대비 최고 30% 이상 활성을 보였다. 홍화추출물은 조골활성 및 파골억제 특성을 모두 나타냈으며 RANKL과 OPG의 상호작용보다는 multinucleate cell의 분화에 대한 억제활성이 보다 높은 것으로 검색되었다. 국산홍화는 품종차이 및 토질 등 재배환경의 차이가 있는 외래산과 비교하여 독성이 낮을뿐 만 아니라 세포 증식 효과도 상대적으로 다소 우수하였고 세포증식능이 농도 증가에도 지속적으로 유지되는 것으로

나타났다. 홍화의 골관련 유전자에 대한 영향은 PTH Receptor, Protein Kinase A, C prostacyclin synthase, collagen type IV 유전자 발현을 현저히 증가시켰으며 calcitonin Receptor, phospholipase A₂, COX, Prostaglandin E₂ synthase 유전자 발현을 현저히 억제하였다. 골강화 활성을 교차검증하기 위하여 Bone matrix 형성과 관련해서는 수평아리 시험계를, 여성호르몬 변화와 관련해서는 난소절제쥐 모델을 활용하였다. 홍화시료는 간, 신장, 당 대사에서 독성을 나타내지 않았으며 골강도를 증가시켰고 Bone matrix와 Bone mineral 형성에 도움을 주는 것으로 나타났다. 홍화 골세포 활성추출물은 온도 및 pH 변화에서 비교적 활성이 유지되어 체내 및가공시 활성성분의 작용 가능성을 시사하였다. 홍화의 골강화 핵심성분을 분리, 정제하여 동정한 경우 lignan 화합물의 일종인 tracheloside 및 N-(*p*-coumaroyl)serotonin mono- β -D-glucopyranoside로 밝혀졌다. 홍화의 가공소재화를 위하여 산화안정을 위하여는 TBHQ와 Tocopherol이 효과적이었으며, 유화성으로는 자당지방산 에스테르가 효과적이었다.

2. 활용에 대한 건의

상기의 결과로부터 홍화의 골강화활성을 확인하고 제형별 골(骨)건강식품 제조 및 성분 활용의 기초를 확립하였다. 현재 관련법령과 농가규모에 따라 제품개발이 이루어질것이나 본 과제 결과를 토대로 활성획분을 활용한 특성화 제품 및 성분의 활용이 이루어질수 있다. 향후 대사계 및 인체실험을 통하여 시장접근적인 연구가 지속될 예정이며 개별인정을 위한 준비를 완료하여 국산 홍화 골강화 제품의 시장 경쟁력을 확고히 하고자 한다. 권리확보 및 기술이전을 통하여 홍화로부터 국내외 최초의 골강화 보편 제품을 생산하고자하며 국민 골건강 향상 및 해당농가의 소득에 기여하고자 한다.

SUMMARY

I. Title

Development of Osteo-Active Supplement from Korean *Carthamus tinctorius* Extract

II. Purpose and Significance of the Study

1. Osteoporosis comes to anybody with aging as hormon unbalance inevitably. Stress, lack of exercise and nutritional trouble are the another factor of osteoporosis. Generally, 10~15% of population is elderly person, and most of them are exposed to osteoporosis.

2. The disease is called silent disease as we have taken a osteoporosis without symptom or serious stroke. Prevention or treatment was not supported as it is chronic and have no subjective symptom.

3. The remedy for osteoporosis was conducted to the conditions of patients case by case. The drugs for the disease are not perfect causing side effect of cancer and cardiac disease.

4. Prevention with physiologically functional food is the better than remedy by chemicals. The plant source against osteoporosis will be screened by assay systems using animal and cell. Safflower, *Carthamus tinctorius* L. has been known orally as effective on the osteoporosis.

5. It was needed to investigate physiological function for osteo-active role, identification of active compounds and processing techniques for commercial products.

III. Contents and Scope of the Study

1. Extraction and evaporation of the sample
 - 1) Comparison of safflower type between Korea and China
 - 2) Extraction yield and approximate composition
2. Preparation and assay on human-like Osteoblast or osteoclast cell
 - 1) Preparation and assay of extract on Osteo-cell system
 - 2) Cell proliferation and formation of collagen
 - 3) Inhibition of osteoclast cell differentiation
3. Gene expression by extract on osteoblast cell
 - 1) Gene expression of vitamin D₃, PTH, calcitonin receptor
 - 2) Gene expression of PKA, PKC, PLA₂, COX, PGE₂, prostacyclin synthase, collagen
4. Animal test on male chick or ovariectomized rat
 - 1) Preparation of animal test system
 - 2) Osteo-active characteristics on male chick
 - 3) Osteo-active characteristics on ovariectomized rat
5. Physicochemical properties of active extract
 - 1) Dose-response of active extract
 - 2) Effect of temperature variation for active extract
 - 3) Effect of pH variation for active extract
 - 4) Characteristics of active extract on osteoblast and osteoclast
6. Isolation, purification and identification from active extract
 - 1) Solvent partition and qualitative analysis of active extract
 - 2) Isolation of active component
 - 3) Purification and identification of isolate

7. Development of commercial product
 - 1) Supercritical carbondioxide extraction from sample
 - 2) Antioxidative properties of active extract
 - 3) Suspension properties of active extract
 - 4) Formulation for commercial product and development of commercial flour or pill
8. Application of the results
 - 1) Achievement and contribution to related field
 - 2) Application plan of the results
 - 3) International trend of food supplement

IV. Results and Recommendation

Korean *Carthamus tinctorius* extract for prevention of osteoporosis was conducted on human-like osteoblast, osteoclast cell and animal model system. The extract activate human-like osteoblast cell proliferation suggesting safe from cell cytotoxicity. Alkaline phosphatase activity as a marker of osteoblast cell proliferation was 40% higher than that of control. Dose-response of ALP activity shows the activity increase as sample concentration increase till 10^{-1} mg/ml. The extract inhibited differentiation of osteoclast cell precursor and multinucleate cell ranging 80%-90% compared to control. The extract is stable on temperature variation and keep the high activity compared to control till 6 minutes of sample heating. The activity shows 20% higher than control at various pH. It suggest that activity of the base is able to stable on change of temperature and pH during processing or absorption in human body.

The extract stimulated expression of PTH Receptor, Protein Kinase A, C prostacyclin synthase, collagen type IV genes, and inhibit expression of calcitonin Receptor, phospholipase A₂, COX, Prostaglandin E₂ synthase genes. Male model have been chosen as bone matrix development, compared to female model of ovariectomized rat as hormone metabolism in animal test. Korean *Carthamus tinctorius* extract showed no cytotoxicity on liver and kidney from ALT, AST, GGT liver factor, and from urea, creatinine, blood glucose of kidney factor. Immunoprotein or enzyme may active for bone turn over as total protein was higher than control. Low value of triglyceride of the extract was due to feed of plant. Alkaline phosphate activity, phosphate content in serum, and bone strength, stiffness suggest *Carthamus tinctorius* was effective on bone mineralization. Active compound is identified to tracheloside within lignan compound and N-(*p*-coumaroyl)serotonin mono- β -D-glucopyranoside. Antioxidants was effective to TBHQ, Tocopherol, and emulsifier was effective to fatty acid ester for commercial product. The material will be studied on metabolism and clinical experiment, then developed health supplement of quality controlled product to market.

CONTENTS

Summary in Korean	3
Summary in English	6
Chapter 1. Outline of the interest	23
1. Object	23
2. Necessity	23
3. Range	25
4. Prospect	25
5. Summary	26
Chapter 2. State of the art	27
Chapter 3. Method and results	28
Chapter 3-1. Materials and method	28
I. Extraction and evaporation of the sample	28
1. Sample preparation and extraction	28
2. Sample condensation for cell assay system	28
3. Sample preparation for animal test	28
II. Preparation and assay on human-like Osteoblast or osteoclast cell	30
1. Osteoblast cell proliferation	30
1.1. Preparation of osteoblast cell	30
1.2 Cell proliferation	31
1.3 Alkaline phosphatase(ALP) activity	31
2. Inhibition of osteoclast cell differentiation	32
2.1. osteoclast cell culture	32
2.2. Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) staining	32

III. Gene expression by extract on osteoblast cell	32
1. sample product	32
2. The effect of gene expression on human osteobalst cell	32
2.1 MG-63 Cell culture	32
2.2 Isolation of tRNA(total RNA)	33
2.3. cDNA preparation	33
2.4. Purification of cDNA	34
2.5. Gene expression and quantity	34
3. Measurement of Protein Kinase	34
3.1. Protein Kinase C activity	34
3.2. Protein Kinase A activity	35
4. Statistics	35
IV. Animal test on male chick or ovariectomized rat	36
1. Inhibition of osteoporosis on male chicks	36
1.1. Experimental design and feeding	36
1.2. Combination table of feed	37
1.3. Animal breeding and control	38
2. Inhibition of osteoporosis on ovariectomized rat	38
2.1. Rat preparation	38
2.2. Ovarietomy	39
2.3. Experimental design and feeding	39
V. Prevention effect of osteoporosis	40
1. Anatomy of the male chicks	40
2. Anatomy of the ovariectomized rats	40
3. Analysis of biochemical factor	40
3.1. Analysis of inorganic P, total Ca and ALP in serum	40
3.2. Content of inorganic P	41
3.3. Content of total Ca	41
3.4. ALP activity	41

4. Performance on the animal feed	42
5. Breaking strength and stiffness	42
6. Statistics	42
VI. Isolation, purification and identification from active extract	43
1. Reagent	43
2. Material and apparatus	43
3. Method	43
3.1. Solvent partition	43
3.2. Spraying reagent for qualitative analysis	44
3.3. Qualitative analysis on thin layer chromatography	44
4. Isolation and Purification	45
4.1. Instrument and reagent	45
4.2. Isolation and purification of active fraction	46
VII. Physicochemical properties of active extract	46
1. Dose-response of active extract	46
2. Effect of temperature variation for active extract	47
3. Effect of pH variation for active extract	47
VIII. Supercritical carbondioxide extraction from sample	47
1. Supercritical carbondioxide extraction of supplements	47
2. Analysis of fatty acid	48
3. Analysis of phospholipid	48
IX. Mineral analysis on femur or tibia	49
X. Antioxidation of active extract	50
1. Sample treatment	50
2. Preparation of active extract	50
3. Antioxidative properties of active extraction	51
3.1. Analysis of acid value	51
3.2. Analysis of peroxide value	51
XI. Process of active extract for commercial product	52

1. Suspension properties of active extract	52
2. Preparation of emulsifier	52
3. Measurement of dispersibility	52
Chapter 3-2. Results	53
I. Extraction and evaporation of the sample	53
1. Comparison of safflower type between Korea and China	53
2. Extraction yield and approximate composition	53
2.1. Concentration yield from sample extract	53
2.2. Approximate composition of sample	54
II. Preparation and assay on human-like Osteoblast or osteoclast cell	55
1. Preparation and assay of extract on Osteo-cell system	55
1.1 Preparation of osteo-cell system	55
1.2. Assay of extract on cell proliferation and enzyme activity	55
2. Cell proliferation and Osteo-cell actination on Calvarial cell	61
2.1 Osteoblast cell proliferation	62
2.2 Investigation of collagen formation	62
3. Inhibition of osteoclast cell differentiation	63
III. Gene expression by extract on osteoblast cell	64
1. Gene expression of vitamin D ₃ receptor	64
2. Gene expression of PTH receptor	65
3. Gene expression of calcitonin receptor	66
4. Gene expression of PKA(Protein Kinase A)	66
5. Gene expression of PKC(Protein Kinase C)	67
6. Gene expression of PLA ₂ (phospholipase A ₂)	68
7. Gene expression of COX (cyclooxygenase)	69
8. Gene expression of PGE ₂ (Prostaglandin E ₂) synthase	70
9. Gene expression of prostacyclin synthase	71
10. Gene expression of collagen	72

11. Effect of safflower on gene expression	73
IV. Animal test on male chick or ovariectomized rat	75
1. Preparation of animal test system	75
1.1. Preparation of animal test system	75
1.2. Preparation of animal test system on male chick	75
1.3. Preparation of animal test system on ovariectomized rat	76
V. Osteo-active characteristics of extract on animal test	76
1. Osteo-active characteristics on male chick	76
1.1. Weight change	76
1.2. Length, thickness and weight of tibia	77
1.3. Breaking strength and stiffness of tibia	78
1.4. Analysis of biochemical factor in serum	79
2. Osteo-active characteristics on ovariectomized rat	83
2.1. Weight change	83
2.2. Weight of internal organs	84
2.3. Breaking strength and stiffness of tibia	85
2.4. Analysis of biochemical factor in serum	86
VI. Physicochemical properties of active extract	91
1. Dose-response of active extract	91
2. Effect of temperature variation for active extract	92
2.1. Effect of various temperature	92
2.2. Effect of process time	92
3. Effect of pH variation for active extract	95
4. Characteristics of active extract on osteoblast and osteoclast	96
VII. Isolation, purification and identification from active extract	97
1. Solvent partition and qualitative analysis of active extract	97
1.1. Yield of partition	97
1.2. TLC profile of extract	97
2. Isolation of active component	98

2.1. Solvent partition of active extract	98
2.2. Column chromatography of partition	100
2.3. Qualitative analysis of active fraction	104
3. Purification and identification of isolate	105
3.1. Identification of active component 1	105
3.2. Identification of active component 2	107
4. Yield of active compound	113
VIII. Supercritical carbondioxide extraction from sample	114
1. Supercritical carbondioxide extraction of supplements	114
2. Content of fatty acid	114
3. Content of phospholipid	115
IX. Antioxidative properties of active extract	116
1. Inhibitory effect of antioxidants in safflower oil	116
1.1 Changes of peroxide value	117
1.2 Changes of acid value	118
X. Development of commercial product	120
1. Formulation for commercial product	120
2. Suspension properties of active extract	120
2.1. Disperse of active component	120
2.2. Measurement of dispersibility	121
3. Development of commercial flour or pill	123
Chapter 4. Achievement and contribution to related field	126
Chapter 5. Application plan of the results	128
Chapter 6. International trend of food supplement	129
Chapter 7. Reference	136

목 차

요약문	3
영문요약문	6
제 1 장 연구개발과제의 개요	23
1. 연구의 목적	23
2. 연구개발의 필요성	23
3. 연구범위	25
4. 앞으로 전망	25
5. 기술도입의 타당성	26
제 2 장 국내외 기술개발 현황	27
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	28
제 3-1 장 연구개발수행내용	28
제 1 절 시료의 용매 추출 및 농축	28
1. 국산시료 확보 및 활성성분추출	28
2. 세포시험용 검액 제조	28
3. 동물시험용 추출물 제조	28
제 2 절 세포계 골강화 활성 시스템 및 검색	30
1. 조골세포의 세포증식 실험	30
1.1. 조골 세포의 선별 및 세포배양	30
1.2. 골세포의 생존능 측정	30
1.3. 조골세포에서의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정	30
2. 파골세포의 증식억제효과	31
2.1. 세포배양	31
2.2. Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) staining	32

제 3 절	활성성분의 세포내 유전자 발현 특성	32
1.	시료 제조	32
2.	조골세포의 유전자발현에 미치는 영향	32
2.1	MG-63 Cell의 배양	32
2.2	tRNA(total RNA) 분리	33
2.3.	cDNA 製造	33
2.4.	cDNA의 정제	34
2.5.	유전자 발현의 확인 및 정량	34
3.	Protein Kinase 측정	34
3.1.	Protein Kinase C 활성 측정	34
3.2.	Protein Kinase A 활성 측정	35
4.	통계처리	35
제 4 절	동물계 골강화 활성 시스템 구축	36
1.	수평아리를 활용한 골다공증 억제 효과	36
1.1.	실험설계 및 실험사료의 급여	36
1.2.	병아리 사료 배합표	37
1.3.	실험동물 및 사양관리	38
2.	난소절제한 암컷 쥐의 골다공증 억제 실험	38
2.1.	실험동물	38
2.2.	난소척출	39
2.3.	실험설계 및 실험사료의 급여	39
제 5 절	홍화의 동물시험계 골강화 활성 검색	40
1.	병아리 해부 및 생체부위 분리	40
2.	난소적출한 쥐의 해부 및 생체부위 분리	40
3.	생화학적 분석	40
3.1.	혈액내 inorganic P, total Ca 및 ALP 측정	40
3.2.	Inorganic P의 분석	41
3.3	Total Ca의 분석	41

3.4. ALP activity의 분석	41
4. 실험동물 사육시 증체량, 사료섭취량 및 식이효율	42
5. 골강도의 물리적 특성 분석	42
6. 통계처리	42
제 6 절 활성성분의 분리 및 물질 특성	43
1. 시약	43
2. 기기	43
3. 실험방법	43
3.1. 용매 분획	43
3.2. 시약 제조 방법	44
3.3. TLC를 이용한 주요물질 정성분석	44
4. 활성성분의 분리 및 정제	45
4.1. 기기 및 시약	45
4.2. 홍화로부터 활성물질의 분리, 정제	46
제 7 절 골강화 성분의 이화학적 특성	46
1. 농도활성 관계	46
2. 온도에 따른 골세포 활성화 변화	47
3. pH에 따른 골세포 활성화 변화	47
제 8 절 활성성분의 초임계 추출방법	47
1. 활성성분의 초임계 추출법	47
2. 지방산의 분석	48
3. 인지질 함량분석	48
제 9 절 발골시료의 무기질 분석	49
제 10 절 활성추출물의 산화안정성	50
1. 시료	50
2. 활성추출물	50
3. 자동산화에 의한 홍화유의 산화안정성 측정	51
3.1. 과산화물가	51

3.2. 산가	51
제 11 절 활성성분의 소재화 활용기술	52
1. 골강화 활성성분의 수용액내 분산	52
2. 유화제의 선정	52
3. 분산도의 측정	52
제 3-2장 연구개발 수행 결과	53
제 1 절 시료의 용매 추출 및 농축	53
1. 토종홍화와 외산(중국산) 홍화 비교	53
2. 원료의 추출수율 및 성분특성	53
2.1. 시료의 농축 수율 및 농도	53
2.2. 시료의 성분특성	54
제 2 절 세포계 골강화 활성 시스템 및 검색	55
1. 골 활성 세포계 시험법의 구축 및 골강화 활성 검색	55
1.1. 골관계 시험법의 구축	55
1.2. 골강화 활성 검색	55
2. Calvarial cell에 의한 홍화시료의 독성 및 조골활성 시험	61
2.1. 골세포의 증식능 측정	62
2.2. Collagen 합성량 측정	62
3. 파골세포 억제활성	63
제 3 절 활성성분의 세포내 유전자 발현 특성	64
1. Vitamin D ₃ 수용체의 발현에 미치는 영향	64
2. PTH receptor 유전자 발현에 미치는 영향	65
3. Calcitonin 수용체 유전자 발현에 미치는 영향	66
4. PKA(Protein Kinase A) 유전자 발현에 미치는 영향	66
5. PKC(Protein Kinase C) 유전자 발현에 미치는 영향	67
6. PLA ₂ (phospholipase A ₂) 유전자 발현에 미치는 영향	68
7. COX (cyclooxygenase) 유전자 발현에 미치는 영향	69

8. PGE ₂ (Prostaglandin E ₂) synthase 유전자 발현에 미치는 영향 ...	70
9. Prostacyclin synthase 유전자 발현에 미치는 영향	71
10. Collagen 유전자 발현에 미치는 영향	72
11. 유전자에 대한 영향의 해석	73
제 4 절 동물계 골강화 활성화 시스템 구축	75
1. 동물계 골강화 활성화 시스템 구축	75
1.1. 동물계 골강화 활성화 시스템 구축	75
1.2. 수평아리를 활용한 시험계의 구축	75
1.3. 난소절제 흰쥐를 활용한 시험계의 구축	76
제 5 절 홍화의 동물시험계 골강화 활성화 검색	76
1. 저칼슘 식이 수평아리 시험계에서 홍화의 골강화 효과	76
1.1. 체중 변화	76
1.2. 경골의 길이, 두께 및 무게	77
1.3. 경골의 breaking strength, max. displacement, elastic stiffness 및 total stiffness	78
1.4. 수평아리의 혈액 지표인자 분석	79
2. 난소적출 실험쥐에서 홍화의 골강화 효과	83
2.1. 체중의 변화	83
2.2. 장기무게	84
2.3. 경골의 성장상태 측정	85
2.4. 난소절제 흰쥐의 혈액 지표인자 분석	86
제 6 절 골강화 성분의 이화학적 특성	91
1. 농도활성 관계	91
2. 온도에 따른 골세포 활성화 변화	92
2.1. 가열온도의 영향	92
2.2. 가열시간의 영향	92
3. pH에 따른 골세포 활성화 변화	95
4. 세포내 작용특성	96

제 7 절 활성성분의 분리 및 물질 특성	97
1. 시료의 용매분리 및 성분특성	97
1.1. 분획물의 수율	97
1.2. TLC를 이용한 주요물질 검정	97
2. 골강화 활성성분의 분리	98
2.1. 홍화의 골강화 활성성분의 용매분획	98
2.2. 용매분획물의 column chromatography	100
2.3. 분리물의 정성분석	104
3. 홍화종자로부터 활성물질의 분리, 동정	105
3.1. 화합물 1의 구조	105
3.2. 화합물 2의 구조	107
4. 활성성분의 수율	113
제 8 절 활성성분의 초임계 추출방법	114
1. 활성성분의 초임계 추출법	114
2. 지방산의 분석	114
3. 인지질 함량분석	115
제 9 절 활성추출물의 산화안정성	116
1. 자동산화에 의한 홍화유의 산화안정성	116
1.1. 항산화제 처리와 과산화물가 변화	117
1.2. 항산화제 처리와 산가 변화	118
제 10 절 활성성분의 소재화 활용기술	120
1. 홍화 소재의 골강화 제품 Formulation	120
2. 액상 제품 개발을 위한 골강화 활성성분의 수용액내 분산	120
2.1. 활성성분의 수용액내 분산	120
2.2. 분산도의 측정	121
3. 분말, 환 등 고형제품의 개발	123
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	126

1. 골강화 활성화 시스템 구축	126
2. 홍화의 골강화 활성화 검색	126
3. 국산 시료 확보 및 활성화 성분 추출	127
4. 홍화 골강화 성분의 이화학적 특성 및 가공특성	127
5. 연구성과물	127
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	128
1. 기술적 측면	128
2. 경제 · 산업적 측면	128
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	129
제 7 장 참고문헌	136

제 1 장 연구개발과제의 개요



홍화는 학명이 *Carthamus tinctorius L.*이며 국화과에 속하는 일년생 화초로서 초장이 100cm 내외이고 줄기는 직립성이다. 토종홍화는 옛날부터 잇꽃이란 이름으로 우리나라에서 재배되었으며 잎이나 꽃받침에 날카로운 가시가 붙어있어 외래종과 외관상 쉽게 구별할 수 있다. 종자의 크기는 해바라기씨 정도로 한 쪽이 약간 납작하며 노란색을 띠면서 갈색이 감돈다.

홍화꽃잎은 예로부터 옷감염료나 연지, 입술화장품으로 이용되었으며 한방에서는 꽃잎은 통경제나 어혈을 풀어주는 파혈제등으로 귀하게 사용되어 오다가 1900년대초에 거의 사라지게 되었다. 그러나 최근 인산(仁山) 김일훈의 「신약본초」에 의하여 홍화씨가 뼈질환 치료 및 예방을 위한 약재로 민간에서 이용되고 있으나 과학적 근거가 없어 이를 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

1. 연구의 목적

- 1) 국산 홍화의 골강화 활성 검증
- 2) 국산홍화의 골강화 활성물질 구성성분 구명
- 3) 활성성분의 추출 및 활용
- 4) 홍화를 이용한 골강화 제품의 기초설정

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

홍화(Safflower, *Carthamus tinctorius L.*)는 잇꽃이라고도 불리우며 국화과에 속하는 일년생 초본이다. 한국, 중국, 일본 등에서 오랜 역사를 가지고 재배하여 온 약용 식물로서 통경제, 어혈제 및 골강화에 효과가 있는 것으로

알려져 있다. 그러나 홍화의 뼈질환 예방 및 치료 효과는 민간구전으로 알려졌을뿐 과학적이고 구체적으로 알려진 내용은 없다. 또한 골강화 활성에 관여하는 성분이 밝혀져 있지 않아 활성성분을 활용한 기술과 제품보다는 단순추출 제품만이 시중에 유통되고 있다. 홍화 재배 농가는 뼈에 이로운 효능 확인, 활성성분의 실체, 활성성분의 추출조건, 추출물의 가공기술 등을 필요로 하고 있다.

2) 경제·산업적 측면

홍화꽃은 적색 염료로 사용하기도 하나, 한방에서는 부인병이나 통경약으로 사용하며, 어린 순은 식용으로 하고, 씨앗은 기름을 짜 식용으로 한다. 홍화에서 추출한 색소는 치즈와 버터 등에 이용하고자 하는 사례가 외국에서 이루어지기도 하였고 일본에서는 홍화의 중추신경에 대한 작용과 항염증작용이 보고되어 있으나 골강화에 관하여는 국내에서만 관심도가 높다. 홍화는 이집트가 원산이나 최근 우리홍화가 뼈에 좋다는 소문이 나면서 중국산 홍화씨가 시중에 유통되고 있다. 홍화의 국내 생산량은 정확한 통계로 나타나있지 않으나 시중에 분말 가공품과 기름이 판매되고 있다. 산가 등을 조절 하거나, 활성성분을 집약적으로 가공 원료화한 골 강화 건강제품은 없으며 산지에서도 필요로 하고 있다. 국내 3,000억, 국외 100억불에 이르는 골강화 예방 및 치료 시장에 참여하기 위하여 과학적인 활성확인 과정 및 성분구명, 활용기술이 이루어져야 한다.

3) 사회·문화적 측면

골관계 질환은 남녀 모두에게 생리적으로 hormone의 변화와 함께 필연적으로 찾아오는 자연노화 현상이다. 전인구의 10%에 이르는 노인 인구는 골관계 질환 대상이며 평균수명 연장, 스트레스, 운동부족 등으로 장년부터 질환이 발생하는 것을 감안하면 환자 수는 현재 약 300만에서 날로 증가하고 있다. 노인 사망 원인의 10% 이상을 차지하는 골관계 질환은 완전한 치료수단이 개발되어 있지 않으며 대중적인 요법만이 있다. 현재 화학적 치료제는 부분적 완화만 보완할뿐 부작용의 동반 등 근본적인 치료에는 한계를 보이고 있다. 진행된 골질환은 치료가 불가능하므로 예방이 필수적이며 천연물로부터

골강화 식품을 섭취하는 연구가 필요하다. 골다공증은 침묵의 병이라 일컬어지는 것처럼 만성적으로 진행되는 점과 생체노화 현상의 하나로 받아들이기 때문에 예방이나 치료시기를 놓치는 경우가 많다. 골량의 감소와 골조직의 미세구조의 이상으로 심한 충격 없이도 쉽게 초래되는 각종골절들로 장기간의 활동제한에 따르는 사회적, 의학적, 경제적 손실을 유발한다. 홍화의 골강화 효과가 구전되자 수요가 증가하여 농약살포와 방부제, 표백제의 문제점을 나타내는 수입산이 토종홍화로 둔갑하여 고가에 유통되고 있으므로 국산 홍화의 건강기능성을 입증하고 활용도를 높여 보호해야 한다.

3. 연구범위

1) 국산 홍화의 골강화활성 검증

가. 세포계 골강화 활성 시스템 구축

나. 동물계 골강화 활성 시스템 구축

다. 홍화의 골강화 활성 검색

2) 홍화 골강화 성분의 구명 및 추출조건

가. 골강화 성분의 이화학적 특성

나. 활성성분의 분획 및 정제 및 구성성분 구명

다. 활성성분의 추출방법 및 조건

3) 홍화 골 강화 활성 물질의 안정성 확보 및 소재화

가. 활성 추출물의 산화 안정성

나. 활성물질의 소재화 활용

다. 골강화 건강 시작품

4. 앞으로 전망

1) 홍화의 골강화 효능 및 성분 확인의 시험지표 기초 제공

2) 활성의 확인으로부터 홍보의 범위 확대 및 생산농가의 매출 증대

3) 국산 홍화의 가공기술 다양화로부터 외국산 홍화와의 차별화

4) 국내 우수 식물자원의 보호 및 권리확보

5) 국민의 골강화 대표 소재 발굴

5. 기술도입의 타당성

홍화의 골강화 효과는 국내에서 처음으로 검증 및 응용되는 것으로서 기술도입의 필요성은 없다. 원산지인 이집트 및 주변 재배국인 중국, 일본 등에 우리 홍화로부터 활성성분의 활용기술을 수출할 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

식물을 활용한 골다공증 예방과 치료는 일본의 경우 잇차 등 식물의 flavonoid를 이용한 소재가 다소 개발되어 있다. 국내에서도 한약재가 골다공증에 효과적일 수 있다는 보고가 있으나 실험적 방법에서 경제적, 시간적 요건을 필요로 하므로 다양한 식물군이 검색되지 못하였다. 세계적으로 골다공증이 고령화 사회의 중요한 의료문제로 대두됨에 따라 예방 및 치료제 개발에 많은 연구가 진행되어 수많은 약제들이 개발되었으나 부작용등으로 인하여 사용이 제한되어 있는 상태이다. 임상에서 현재 사용되는 약물로는 골형성을 촉진과 골흡수 차단 약제로 나눌수 있는데, 주로 calcitonin 등 thyroid hormone 류와 steroid, fluoro compound 등의 화학제가 있으나 모두 심각한 한계점을 가지고 있다. 부작용을 낮추면서도 이미 진행된 골관절계 질환의 치료를 위한 새로운 방법이 필요하며, 천연물을 이용한 골 강화작용이 해결방법이 될 수 있다. 골강화 관련 건강식품은 연구결과 등을 고려한 과학적인 제품보다는 인산칼슘을 사용한 단순 배합제제만이 판매되고 있는 실정이다. 홍화의 경우 국외에서 홍화잎을 이용한 적색 염료 및 식품색소로 이용하거나 중추신경계 및 항염증에 시도한 예는 있으나 연구가 활발하지는 못하였으며 골강화 활성화에 적용한 연구는 국내가 유일하다. 따라서 활성과 성분의 확인, 추출방법과 조건, 시제품 제조를 위한 기초 등이 현재 요구되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 3-1 장 연구개발수행내용

제 1 절 시료의 용매 추출 및 농축

1. 국산시료 확보 및 활성성분추출

참여기업(의성 우리홍화인 영농조합)으로부터 순수국산시료를 확보하여 산화 안정성을 위하여 분쇄와 동시에 추출하였다. 홍화의 추출은 저분자 및 고분자를 광범위하게 포함하기 위하여 에탄올:물(8:2) 용액으로 추출하였다. 시료의 일반성분, 비질소화합물, 칼슘함량 등을 분석하였다.

2. 세포시험용 검액 제조

홍화를 80 % 에탄올로 3시간동안 반복 추출·여과한 후 감압 농축하고 이를 동결건조하여 분말을 얻었다. 본 실험에 사용 시 DMSO에 용해한 후 희석하여 농도별로 사용하였고, DMSO의 최종농도는 0.1% 이하로 하였다.

3. 동물시험용 추출물 제조

골다공증 억제활성 동물시험을 위한 홍화시료의 추출 및 농축 과정은 Fig. 1과 같다. 시료를 정선, 분쇄하여 80% 에탄올로 추출하고 여과한 다음 진공 증발 농축기로 대량 농축하여 30°Bx의 농도로 균일하게 조절하였다. 동물시험의 기초를 위하여 추출 및 농축 수율을 조사하였다.

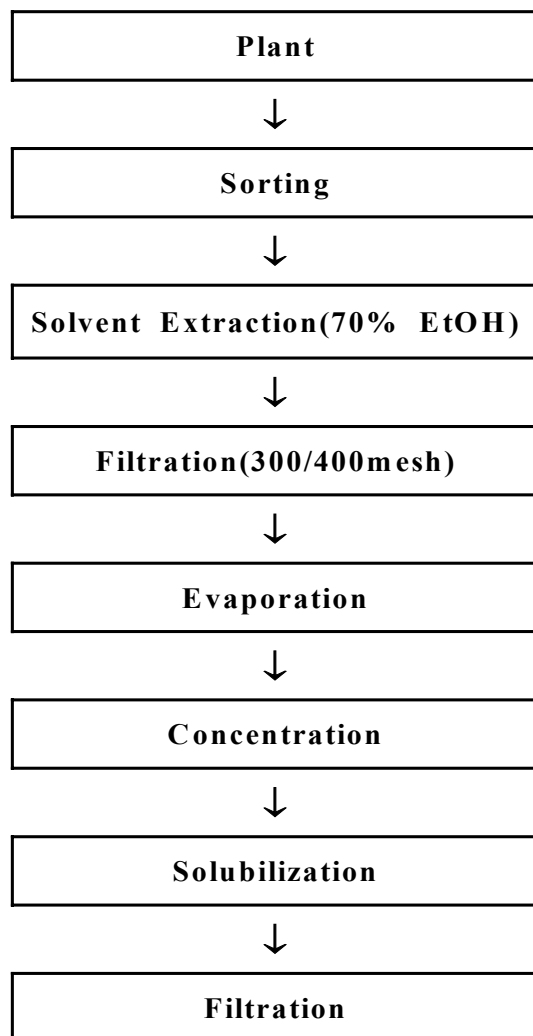


Fig 1. Scheme for sample extraction and concentration

제 2 절 세포계 골강화 활성 시스템 및 검색

1. 조골세포의 세포증식 실험

1.1. 조골 세포의 선별 및 세포배양

인체 조골 유사 세포인 MG-63 cell과 Saos-2 cell은 한국 세포주 은행으로부터 분양 받아 본 실험에 사용하였다. MG-63 cell은 DMEM 배지, Saos-2 cell은 RPMI 1640를 사용하였다. 각각의 배지에는 1% penicillin-streptomycin (100 units/ml, Gibco, BRL, U.S.A)와 10% fetal bovine serum을 포함시켰다. 5% CO₂가 유지되는 37 °C humidified incubator에서 배양하면서 일주일에 2~3회 feeding하고 배양세포는 trypsin-EDTA를 이용하여 flask로부터 분리, 계대배양 하였다. Calvarial cell은 임신 21일 된 쥐(rat)의 자궁을 절개하여 fetus를 꺼낸후, 후두부를 절개하고 calvarie를 적출하였다. Calvarie에 붙어있는 결체조직을 제거하고, 세척, 효소반응 등으로부터 calvarial cell을 얻었다.

1.2 골세포의 생존능 측정

Mosmann(1978)의 방법에 따라 2×10^4 cells/well이 되도록 조절하여 각 농도별 sample과 함께 96 well plate에 분주하고 3일간 배양하였다. 배양액으로만 세포배양한 시험군을 대조군으로 하고, sample 군은 농도별($1 \times 10^{-1} \sim 10^{-8}$ mg/ml)로 적용하였으며 positive control로는 NaF(Sigma Co., U.S.A)와 1,25(OH)₂D₃를 사용하였다. 분석당일 MTT(3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co., U.S.A) solution(0.5 mg/ml. final conc.)을 well당 20 μ l씩 적용시킨 후 4시간동안 배양하고 배양액을 제거한 후 dimethylsulfoxide(DMSO)를 150 μ l씩 넣어 5분간 방치하면서 MTT formazan을 용해하였으며, 5분후 ELISA reader로 흡광도(550nm, 37°C)를 측정하여 control % 비로 비교하였다.

1.3 조골세포에서의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

Majeska(1982)등의 방법에 따라 무색의 p-nitrophenylphosphate를 노란 색의 p-nitrophenol과 phosphate로 분해를 촉진시키는 ALP 활성을 측정하였다. 먼저 MTT 실험과 같이 Saos-2 cell을 2×10^4 cells/well이 되도록 조절하여 각 농도별 sample과 함께 96 well plate에 분주하고 48 시간 배양하였다. 배양액만으로 세포배양한 균을 대조군으로 하고 sample 군은 농도별($1 \times 10^{-1} \sim 10^{-8}$ mg/ml)로 적용하였으며, NaF를 positive control로 사용하였다. 배양액은 48시간 배양 후 Ice 상에서 1% Triton x-100/in PBS(final conc.) 200 μ l/well를 넣어 용해시킨 후 sonication(15 sec)하고 원심분리(14,000 rpm, 20min, 4°C)하였다. 원심분리 후 상층액을 4 μ l씩 96 well plate에 놓고 ALP test kit reagent(Thermo Trace kinetic method kit)를 200 μ l씩 첨가한 후 microplate reader(405 nm)를 이용하여 1분간 반응시킨 후 2분간 측정하여 control % 비로 비교하였다.

2. 파골세포의 증식억제효과

2.1 세포배양

Osteoclast precursor kit(Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.)를 이용하였다. Osteoclast precursor basal medium에 fetal bovine serum(10% final conc.), L-glutamin(100 units/ml final conc.), penicillin(100 ug/ml final conc.)를 첨가하여 osteoclast precursor growth medium(OCP Growth medium)을 만들어 cell을 해동하여 세포수가 1×10^6 cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다. Soluble rank ligand와 rhM-CSF를 넣은 OCP Growth medium을 96 well plate에 100 μ l/well씩, cell은 1×10^5 cells/well이 되도록 하였다. Negative control은 soluble rank regand를 첨가하지 않은 OCP Growth medium을 첨가하여 multinucleate cell로의 발현에 영향을 미치지 않게 하였다.

2.1.1. 파골세포의 분화에 미치는 효과

농도별로 희석된 각 sample(0.5% DMSO)을 cell과 같이 적용시켜

5% CO₂가 유지되는 37 °C humidified incubator에서 7일간 배양하였다

2.1.2. 분화된 파골세포의 억제에 미치는 효과

분화된 파골세포의 억제를 알아보기 위해 cell 분주 5일 후 multinucleate cell 형성을 확인한 후 sample을 적용시켜 3일간 추가로 배양하였다.

2.2. Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) staining

분화된 파골세포의 수는 assay kit(Sigma Co., U.S.A)를 이용하여 TRAP을 발현하는 다핵세포의 개수로 나타내며 3개 이상의 핵을 가지는 TRAP-positive cell을 판정하였다.

제 3 절 활성성분의 세포내 유전자 발현 특성

1. 시료 제조

홍화 100g을 3차증류수 1,000ml를 가하고 6시간 이상 가열하여 환류추출하였다. 여과지를 이용하여 여과한 다음, 여액을 Evaporator(EYERA, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 농축액을 동결건조하여 실험시까지 냉동보관 하였다. 실험시에는 CF 추출분말을 배지에 녹인 후 pore size 0,45um 의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

2. 조골세포의 유전자발현에 미치는 영향

2.1 MG-63 Cell의 배양

인간의 골에서 얻은 Cell-line인 MG-63을 급속히 해동시킨 후, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지(SM-PC, fungizone 포함)에 배양하였다. 7일간 배양 후 세포를 수거한 다음, 세포 수 6×10^6 cell/ml 이 되도록 현탁시켜 4시간 배양하였다. CF 추출물을 배지에 녹인 후 0.45um pore size를 가

진 membrane filter에 통과시킨 시험용 sample을 배양된 세포에 50ug/ml의 농도가 되도록 첨가하여 15시간 배양하였다. 여기에 대조군에는 샘플 cy3를 시험군에는 cy5를 50ug/ml이 되도록 처리한 다음 10시간을 추가 배양하였다.

2.2 tRNA(total RNA) 분리

RNA를 분리하기 위하여 배양세포의 배지를 제거한 다음, 4°C PBS로 3회 washing 하였다. 세포를 모은 다음, 750 x g에서 10분간 원심 분리한 다음, ice cold PBS로 2회 씻었다. 침전된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000 x g에서 10분간 원심 분리하여 상층을 취하였다. 다시 1M sucrose가 함유된 Tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000 rpm에서 160분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 녹인 후, 37°C에서 30분간 incubation 시켰다. Sod. Acetate buffer를 가한 다음, phenol/CsCl₃ 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2M이 되도록 가한 다음, EtOH를 가한 후 -20°C에서 12시간 보관하였다. 침전물을 75% EtOH로 2회 washing한 다음 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군과 시험군에서 mRNA양이 같도록 조정한 다음, 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

2.3. cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA 액(13ug RNA 함유)에 oligo dT 1ul을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70°C에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1M DTT, dUTP nucleotide, dUTP Cydye-labelled nucleotide, Cyscript reverse transcriptase을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation 한 후, 얼음상에 방치하였다. 여기에 2.5M NaOH을 가한 후 37°C에서 15분간 incubation하였으며, 2M HEPES buffer를 가하여 중화시켰다.

2.4. cDNA의 정제

제조된 cDNA 액을 GFX column상에 loading한 다음, capture buffer와 washing soln을 사용하여 elution시켰다. Cy3-, Cy5- labelled cDNA 양을 각각 60ul 만큼 elution하였다.

2.5. 유전자 발현의 확인 및 정량

각각의 cy3-, cy5- labelled cDNA를 speed vacum container에 3시간 동안 건조한 다음, nuclease free water에 녹였다. 95°C에서 가열한 다음, 곧바로 얼음상에 30초 이상 방치하였다. 여기에 hybridization buffer와 100% formamide를 가한 후 조심스럽게 섞었다. 혼합된 액을 microarray slide와 cover slip 사이에 loading하였다. cDNA가 loading된 microarray slide를 hybridization chamber에 넣고 42°C에서 18시간 동안 incubation하였다. microarray slide를 SDS가 함유된 55°C로 가온된 SSC(saline, SDS, citrate)buffer에 넣어 55°C에서 10분간 2회 washing하였다. 다시 희석한 SSC buffer로 상온에서 10분간 washing한 다음, 1,000rpm에서 2분간 원심 분리하였다. 데시케이터에 1시간 방치하여 건조한 다음, scanner에 넣고 발현된 mRNA양을 측정하였다.

3. Protein Kinase 측정

3.1. Protein Kinase C 활성 측정

배양된 골세포에 일정시간 동안 홍화자 추출물을 4시간 처리한 후 PBS로 세번 세척하였다. 추출용 완충액 (20mM Tris, 0.5mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.5% Triton X-100, 25 μ g/ml aprotinin, 25 μ g/ml leupeptin, pH 7.5) 1ml로 세포를 취하여 4°C에서 teflon homogenizer를 이용하여 세포를 분쇄하였다. 15,000rpm으로 2분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 여기서 얻은 세포 추출물을 희석하여 실험 하였다. 세포 추출물 15 μ l에 추출용 완충액 10 μ l를 가하고, 지질용액(2.8mg/ml phosphatidyl serine

을 포함하는 Triton X-100 mixed micelles) 5 μ l 또는 억제제 용액(100 μ M PKC, 20mM Tris, pH 7.5) 10 μ l를 가한 후 전체량을 물을 이용하여 35 μ l로 맞추었다. 기질용액은 PMA (100 μ M)를 포함하는 것과 포함하지 않는 두 가지를 사용하여, 반응액 중에서 PKC의 완전 활성화를 요구하는 것과, 세포 추출물에 고유하게 존재하는 PKC 활성만을 측정하는 두 가지 조건을 설정하였다. 20분 동안 상온에서 방치하였다.

25 μ Ci/ml의 [γ -³²P]ATP (370MBq/10mCi/ml, 9.25MBq)를 포함하는 PKC 기질용액(250 μ M Ac-MBP, 100 μ M ATP, 5mM CaCl₂, 100mM MgCl₂, 20mM Tris, pH 7.5) 10 μ l를 가하고 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액 25 μ l를 취하여 phosphocellulose 용지에 점적하고 1% H₃PO₄ 용액으로 2번 세척하고, 다시 물을 이용하여 세척한 뒤 방사선량을 측정하였다.

3.2. Protein Kinase A 활성 측정

배양된 골세포에 4시간 동안 홍화자 추출물, isoproterenol을 처리한 후 PBS로 세번 세척하였다. 추출용 완충액 (50mM Tris, 5mM EDTA, pH 7.5) 1ml로 세포를 취하여 4 $^{\circ}$ C에서 homogenizer를 이용하여 세포를 분쇄하였다. 15,000rpm으로 2분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 세포 추출물을 10 μ l씩 취하고, 50mM Tris (pH 7.5) 용액을 가하여 전체 양을 30 μ l로 맞추었다. 15분간 상온에서 방치한 후 25 μ Ci/ml의 [γ -³²P]ATP (370MBq/10mCi/ml, 9.25MBq)를 포함하는 PKA 기질용액(200 μ M Kemptide, 400 μ M ATP, 40mM MgCl₂, 1mg/ml BSA, 50mM Tris, pH 7.5) 10 μ l를 가하고 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액 20 μ l를 취하여 phosphocellulose 용지에 점적하고 1% H₃PO₄ 용액에 담그어 2번 세척하고, 다시 물을 이용하여 세척한 뒤 방사선량을 측정하였다.

4. 통계처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다.

제 4 절 동물계 골강화 활성 시스템 구축

1. 수평아리를 활용한 골다공증 억제 효과

1.1. 실험설계 및 실험사료의 급여

무기질 침착과 골강화를 판단할수 있다는 점에서 성장속도가 빠른 수평아리 시험계 모델을 개발하였다 (Table 1).

Table 1. Lethal rate with calcium diet level

Calcium diet level	Osteoporosis (Lethal rate)
15%	Osteoporosis extreme (20%)
20%	Osteoporosis serious (0.1%)
30%	Osteoporosis something (0%)
40%	Bone density normal

저칼슘 식이군중 15%이하의 식이는 7일내에 다리관절 부실 및 기본적인 운동량 감소에 따라 폐사가 유발되었다. Calcium 20% 식이군은 폐사율은 거의 없으나 골다공증이 심하였고 30% 식이군은 골다공증을 다소 유발하면서 운동량의 변화와 폐사율이 발생치 않아 저칼슘 식이 모델은 calcium 요구량의 30%로 설정하였다.

생후 1주령까지 low calcium diet(요구량의 30%)를 급여하여 난황흡수, 부화시간 차이등에 의한 변수를 제거하고 가벼운 골다공증을 유발한 뒤 low calcium diet(요구량의 30%)에 각 원료를 3% 첨가한 실험사료를 3주간 급여하였다. 예비 사양기간인 1주령까지는 1가지 사료를 사용하지만 2주령부터는 실험사료와 대조군사료(30% calcium사료) 사료를 급여하였다. 시료의 첨가시 cellulose와 대치하여 3%를 첨가하며 시료로부터 유래한 칼슘함량을 고려한 사료에는 CaCO_3 0.04% 대신 cellulose를 첨가하였다. 따라서 실험사료의 cellulose 함량은 2.04%이며 이는 에너지등의 변화를 최소화하기 위함이었다.

칼슘은 요구량에 비해서 부족하게 공급하지만 인은 요구량 수준을 충족하게 하였다.

1.2. 병아리 사료 배합표

실험설계를 수행하기 위한 병아리 사료 배합표는 Table 2와 같다.

Table 2. Formulations of low calcium and experimental diet¹⁾⁻¹²⁾

Ingredients	Low calcium diet (30% of Ca require)	Experimental diet
Glucose H ₂ O	65.82	65.82
Casein(HCl)	20.00	20.00
Cellulose	4.60	1.60
Safflower	-	3.00
Corn oil	3.00	3.00
DL-Met	0.50	0.50
Arginine	0.80	0.80
Glycine	2.00	2.00
Choline Cl	0.20	0.20
CaCO ₃	0.42	0.42
KH ₂ PO ₄	1.10	1.10
Vitamin mix	0.20	0.20
Mineral mix	1.36	1.36
Total	100.00	100.00

- ¹⁾ Daesang Co., ²⁾ Dupont Co.(France), ³⁾ Sigma Co.(USA), ⁴⁾ Daesang Co.(Korea)
⁵⁾ Sigma Co.(USA), ⁶⁾ Sigma Co.(USA), ⁷⁾ Duksan Co.(Korea), ⁸⁾ Sigma Co.(USA),
⁹⁾ Junsei Co.(Japan), ¹⁰⁾ Junsei Co.(Japan)
¹¹⁾ vitamin mix(per kg diet): niacin 50mg, pantothenate 30mg, pyridoxine 7.8mg, thiamin 20mg, riboflavin 15mg, folic acid 6mg, vitamin k 2mg, biotin 1mg, vitamin A 5200 IU, vitamin D₃ 600 IU, vitamin E 50mg, vitamin C 250mg, inositol 100mg, BHT 100mg (All vitamins were manufactured by Roche Co. (Sweden).)
¹²⁾ mineral mix(per kg diet): NaCl 8.8g, MgSO₄ • 7(H₂O) 3.5g, MnSO₄H₂O 0.65g, ZnCO₃ 0.10g, Ferric citrate 0.50g, CuSO₄ • 5(H₂O) 0.02g, Na₂SeO₃ 0.0002g, KI 0.04g, CoSO₄ • 7(H₂O) 0.001g, H₃BO₃ 0.009g, Na₂MoO₄ • 2(H₂O) 0.009g (All compounds were produced by Junsei Co.(japan)

1.3. 실험동물 및 사양관리

홍화가 어린 동물의 각각의 장기 및 뼈 발육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 갓 부화한 육계 수컷 산란종 병아리(품종: Hy-Line Brown)를 사용하였다. 산란종 수컷 병아리 300수(체중 약 34g)를 입추하여 사육하고 7일령에 처리구 간에 평균체중에 차이가 없도록 처리당 4반복씩 선별하여 반복당 8수씩 철제 케이지에 임의배치하여 총 140마리를 사육하였다. 실험기간 동안 실험사료와 물은 *ad libitum*으로 공급하였고, 육추실의 온도는 초기 34°C에서 1주마다 2°C씩 감온하였다. 점등은 하루 24시간 실시하였으며, 기타 사양관리는 실험실 관행에 준하여 실시하였다.

사료내 단백질 급원은 총 isoflavone 함량이 41 ug/g protein 수준으로 매우 낮은 soy protein concentrate(SPC)를 사용하였다. 이 기초사료는 칼슘을 제외한 다른 영양소들은 모두 NRC 사양표준에 준하여 배합하였으며, 조단백질은 19%, ME(metabolizable energy)가 3,100 kcal/kg이었다. 실험기간은 총 3주간으로 처리구는 홍화가 뼈에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기초사료(basal diet)에는 전체 칼슘 요구량의 30%를 첨가하여 골다공증을 유도하고 유효 인(available P)의 함량은 적정요구량 수준으로 첨가하여 인이 제한요인으로 작용하지 않도록 하였다. 실험사료는 기초사료에 cellulose 첨가량의 일부(전체 3%)를 시료 추출물로 대체·첨가하였으며 CaCO₃는 기초사료와 추출물의 칼슘함량을 비교·보정하여 첨가하였다. 예비 사양기간인 2주령까지는 단일 시판사료를 급여하였으며 3주령부터는 홍화 실험사료를 급여하여 실시하였다.

2. 난소절제한 암컷 쥐의 골다공증 억제 실험

2.1. 실험동물

실험동물은 평균체중 110g, 6주령 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat, 대한 실험동물센터)를 입식한 후 평균체중이 200g±2.65이 되었을 때 개복수술만 실시하였다. 이들 실험동물은 개별 cage에 수용하여 매일 일정시간에 사양관리를 실시하였으며 사육실의 채광은 22±2°C로 유지하였으며 물과 사료는 자유로이 먹을 수 있도록(*ad libitum*) 하였다. 기타 사양은 일반사양관리에 준하여

실시하였다.

2.2. 난소적출(ovariectomy)

12주령된 암흰쥐를 대상으로 난소적출(卵巢剔除)실험을 수행하였다. 난소적출은 에틸에테르(ethyl ether)로 흰쥐를 마취시킨 다음 요각으로 부터 10~15mm전방, 척추로부터 15~20mm 하방부위의 피부를 10~15mm정도 절개하였다. 그 다음 절개구를 통하여 가위의 둔연이나 핀셋으로 피부가 자유로이 움직일 수 있도록 복벽과 분리시킨 다음 복벽을 5~7mm정도 근섬유의 방향으로 절개하여 바로 밑의 난소를 싸고 있는 백색의 지방조직을 서서히 끌어내어 반전시키면 난소가 노출시켰다. 그 다음 난관-자궁접합부에서 혈관이나 지방조직을 함께 결찰하고 결찰부위의 난소를 절제한 후 자궁과 지방조직을 복강내로 밀어 넣어 복벽과 피부를 각각 1~2개소 봉합하였다. 절개부위는 염증방지를 위하여 페니실린을 도포하였다.

2.3. 실험설계 및 실험사료의 급여

2.3.1. 실험설계

실험군은 개복수술만을 한 위군(Sham군), 개복수술을 하여 난소를 적출한 Control군, 난소 적출을 한 후 홍화를 건조대비량 3% 농도로 급여한 홍화군으로 나누어 실험하였다.

2.3.2. 실험사료의 급여

난소적출시술후 6일부터 6주째 되는 날까지 Sham군과 Control군은 일반(고형)사료를, 홍화군은 홍화 추출물을 건조대비량 3% 농도로 공급하였다. 실험사료급여는 난소시술후 7일부터 실시하였다. 실험식은 일반 고형사료(삼양배합사료, 삼양 Co.)에 홍화 추출물을 3%(건조대비량)첨가하여 제조한 고형사료로 하였으며 난소적출한 다음 적응기간 7일후, 6주간 실험사료를 급여하였다.

제 5 절 홍화의 동물시험계 골강화 활성 검색

1. 병아리 해부 및 생체부위 분리

분석시료는 실험 개시 후 3주 경과시 매 주에 걸쳐 각 처리당 8수씩 선정하여 채취하였다. 분리한 혈청은 -70°C 에서 냉동보관하면서 calcium, phosphorus, total protein, albumin, total cholesterol, ALP(Alkaline phosphatase), AST(aspartic aminotransferase, GOT), ALT(alanine aminotransferase, GPT), BUN, triglyceride 측정에 사용하였다. 경골 및 대퇴골의 채취는 병아리를 경추분리 시켜서 희생시킨 후 실시하였으며 채취한 경골과 대퇴골은 분석시까지 -70°C 에서 보관하였다. 뼈의 길이, 무게, 밀도, 회분, 칼슘함량 및 파괴강도 등은 모두 경골로부터 측정되었다.

2. 난소적출한 쥐의 해부 및 생체부위 분리

난소적출 6주째 되는 날 ether로 마취시킨 다음, 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 상온에서 약 2시간 방치시킨 후 3000 rpm, 15분간 원심분리시켜 상층의 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 calcium, phosphorus, total protein, albumin, total cholesterol, ALP, AST(aspartic aminotransferase, GOT), ALT(alanine aminotransferase, GPT), BUN, triglyceride 측정에 사용하였으며 간과 신장을 적출하여 식염수에서 혈액과 결합조직을 제거하고 무게를 측정하였다.

3. 생화학적 분석

3.1. 혈액내 inorganic P, total Ca 및 ALP 측정

분석을 위한 혈액은 병아리의 경정맥을 통하여 채취하였으며, 수집된 혈액은 원심분리기(D 7200, Hettich Universal)를 이용하여 3000 rpm에서 15분간 회전시켜 혈청(serum)을 분리하였다. 혈액내 calcium의 농도 측정을 위하여, EDTA이나 Heparin 등과 같은 항응고제는 사용하지 않았다. 혈청은 분석

시까지 -70°C 에서 냉동보관 하였다. 혈액내 inorganic phosphorus, total calcium, 및 ALP activity는 automatic clinical analyzers (Hitachi 747)로 측정 하였다.

3.2. Inorganic P의 분석

혈청내 inorganic P는 Crook 등(1996)의 방법에 의하여 분석되었다. 즉, phosphate ions은 molybdate와 반응하여 $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$ 와 같은 무색의 phosphomolybdate complex를 형성한다. 이 화합물은 UV 340 nm 하에서 측정되며 complex heteropolymer인 molybdenum(blue)로 환원된 후 600 ~700 nm 에서 측정되기도 한다. 다른 화합물에 의한 방해작용을 보정하기 위해 340 nm에서 측정한 후, 660 nm에서 다시 측정하였다.

3.3. Total Ca의 분석

혈청내 total Ca는 Corns 등(1987)의 방법에 의하여 분석되었다. 즉, Ca는 pH 10-12사이에서는 ortho-cresolphthalein complexone과 반응하여 붉은색의 complex를 생성한다. 복합체에 KCN을 가하여 중금속에 의한 방해작용을 제거하고 안정화한후 8-hydroxyquinoline을 첨가하여 Mg에 의한 방해작용도 제거하였다. 이 복합체를 570-575 nm 에서 측정하였다.

3.4. ALP activity의 분석

혈청내 total alkaline phosphatase는 뼈의 골화(mineralization)와 관련된 뼈형성 marker이다. 혈청내 ALP activity는 Tietz 등(1983)의 방법에 의하여 분석되었다. 즉, 혈청 중의 ALP는 알카리 용액중에서 기질인 p-nitrophenyl phosphate를 p-nitrophenol과 phosphate로 유리하게 하는데, 이 때, p-nitrophenol의 흡광도 증가속도를 측정하여 ALP activity를 구하였다.

4. 실험동물 사육시 증체량, 사료섭취량 및 식이효율

실험동물의 증체량과 사료 섭취량은 실험기간 중 매주 측정하였는데, 개체

간의 차이를 최소화하기 위하여 각각의 케이지당 8수 이상씩의 반복구를 두어 그 평균값을 취하였다. 식이 효율은 각각의 실험기간 중 한 마리 당 평균 섭취량을 평균 증체량으로 나누어서 계산하였다.

5. 골강도의 물리적 특성 분석

5.1. 경골의 파괴강도(breaking strength) 및 stiffness 측정

경골의 파괴강도(Breaking strength)와 경직도(stiffness)는 Turner 등 (1993)의 방법을 이용하여 측정하였다. 파괴강도(Breaking strength)와 경직도(stiffness)는 three-point loading, 즉 caliper를 이용하여 경골의 길이를 잰 후, 그 중앙부위와 중앙으로부터 양끝으로 같은 거리에 위치한 두 지점을 표시하고, 뼈의 중앙에 load로 힘이 가해졌을 때, 양끝이 두 지점에서 받는 힘의 크기로써 측정하였다.

경골의 경직도(stiffness)의 측정원리 및 방법은 다음과 같다. 즉, 일반적으로 뼈에 힘을 가하면, 이에 반응하여 변형(deformation)이 일어나 load-deformation curve가 그려지며, 이 curve는 elastic deformation region과 plastic deformation region의 두 부분으로 나눌 수 있다. Elastic deformation region에서는 뼈에 가해지는 힘이 증가함에 따라 deformation이 비례하여 증가하므로 직선의 그래프를 나타내며, 그 기울기는 elastic stiffness (kg/mm)가 된다.

경골의 파괴강도(breaking strength)는 three-point loading시 뼈가 받는 힘의 최대값을 취하였다. 본 실험에 사용된 Instron은 load cell의 범위가 200 kg으로 crosshead speed는 0.1 mm/s였으며, 이 모든 과정은 ASTM standard에 준하여 실시하였다.

6. 통계처리

모든 실험결과의 통계분석은 statistic analysis system (SAS) 프로그램을 이용하였으며, 결과는 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 유의성 여부는 One-way ANOVA(analysis of variance)법에 의하여

검증하였으며, 각 처리구별 평균값 사이의 차이는 general linear model(GLM)로 분석하고 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의수준 5% 수준에서 표시하였다. 실험 2의 경우, 칼슘과 tamoxifen의 상관관계는 Two-way ANOVA를 모두 이용하여 검증한 후, 위와 동일한 과정을 거쳐서 유의수준 5% 수준에서 명시하였다.

제 6 절 활성성분의 분리 및 물질 특성

1. 시약

TLC(Thin Layer Chromatography)는 Merck사에서 생산한 HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄를 사용하였다. 시료분획에 사용한 유기용매는 대정화학주식회사에서 생산한 1급 시약을 사용하였다. 시료의 발색에는 UV lamp와 10% aq. H₂SO₄, Dragendorff's reagent 및 Ferric chloride를 사용하였다.

2. 기기

UV lamp는 Spectrometer(Model ENF-240C/F, spetronics corporation, USA)를 사용하였다.

3. 실험방법

3.1. 용매 분획

시료를 감압농축하여, 각각의 농축물들을 물(600ml)과 *n*-hexane(600ml)로 분배·추출하고, 물층을 다시 EtOAc(600ml)로 분배·추출하였으며, 다시 한번 물층을 *n*-BuOH(600ml)로 분배·추출하여 얻어진 분획을 감압농축하여 *n*-hexane Fr., EtOAc Fr., *n*-BuOH 및 H₂O Fr.을 얻었다(Fig. 2).

Safflower

Fig. 2. Solvent partitioning of Safflower extract

3.2. 시약 제조 방법

3.2.1. Dragendorff's reagent

Basic bismuth nitrate(1.7g) 와 tartaric acid(20g)를 물 80ml 에 용해(Solution a)시키고, 16g potassium iodide를 물 40ml에 용해(Solution b) 시켰다. Solution a와 b를 1:1로 섞어 stock solution을 만든다. 10g의 tartaric acid를 물 50ml에 용해시킨 뒤 stock solution 5ml를 섞었다.

3.2.2. Ferric chloride

0.1N HCl에 1-5% ferric chloride의 solution을 만들었다.

3.3. TLC를 이용한 주요물질 정성분석

용매분획물인 *n*-hexane 분획, EtOAc 분획, *n*-BuOH 분획 그리고 H₂O 분획에 대하여 TLC를 이용하여 성분을 추정하였다. *n*-Hexane 분획과 EtOAc 분획에 대한 TLC의 전개 용매로는 *n*-hexane : EtOAc = 1 : 1과

CHCl₃ : MeOH = 10 : 1의 비율로 혼합한 용매를 사용하였고, *n*-BuOH 분획과 H₂O 분획에 대해서도 CHCl₃ : MeOH : H₂O = 6 : 4 : 1의 용매를 사용하였다. 준비된 용매가 들어있는 TLC chamber안에 시료를 흡착시킨 TLC를 넣어 전개시킨 뒤 건조하여 UV lamp로 형광 또는 흡수가 있는 부분을 표시하였다. 다음에 10% H₂SO₄ 수용액에 담근 후 건조시켜 알코올 램프로 가열하여 발색되는 양상과 R_f 값을 확인하였다. 또한 동일한 조건으로 전개시켜 건조한 TLC에 Dragendorff's reagent 및 Ferric chloride를 spray하여 발색되는 양상을 확인하였다. 이 때 Dragendorff's reagent와 오렌지색으로 반응하는 화합물은 alkaloid 이며 Ferric chloride와 청색으로 반응하는 화합물은 phenolic acid 이다.

4. 활성성분의 분리 및 정제

4.1. 기기 및 시약

Column chromatography용 silica gel은 Kiesegel 60 (70~230 mesh)와 octadecylsilica gel은 Lichroprep RP-18 (40-63 μm, Merck, Germany)를 사용하였고, TLC는 Kiesegel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254S}(Merck, Germany)를 사용하였다. 시료의 추출과 분획에 사용한 유기용매는 대정화학주식회사와 삼정화학주식회사의 1급 시약을 사용하였다. 기기분석에 사용된 NMR용 용매는 CDCl₃(Merck, Germany)을 사용하였다. GC분석에 사용된 용매는 CHCl₃(Fisher Scientific, Korea)의 HPLC grade를 사용하였다. TLC상의 물질 검출에는 UV lamp와 10% aq H₂SO₄를 사용하였다. 지방산의 modification을 위하여, N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide 95 %(ACROSS, USA)를 사용하였다. GC 기기로는 FID(Flame Indicating Detector)가 설치된 GC-14B(Shimadzu, Japan)에, 분리용 DB-5 column(30 m × 0.32 mm ID × 0.25 μm, J&W, Folsom, CA, USA)으로 측정하였다. GC-MS는 HP 6890(Hewlett-Packed, USA)에 달린 mass spectrometer(HP 5973, Hewlett-Packed Alto, CA, USA)로 측정하였다.

4.2. 홍화로부터 활성물질의 분리, 정제

건조 세절한 홍화(*Carthamus tinctorius* L.)의 씨 3.8kg에 80% aq. MeOH을 가하여 가끔 진탕하면서 실온에서 하루씩 3회 반복하여 추출하였다. 그 추출액을 감압 농축하여 MeOH Ext.를 237g 얻었고, 이 추출물에 증류수 2ℓ를 가하여 현탁시키고 동량의 EtOAc 및 *n*-BuOH의 순으로 용매 분획하여 EtOAc(54g), *n*-BuOH 및 물 분획물을 얻었다. 이들 분획 중 골다공증에 관련된 ALP 활성이 가장 좋은 EtOAc 분획으로 활성 물질을 분리하였다.

EtOAc 분획물(CTE)을 silica gel column chromatography(*n*-hexane : EtOAc = 5 : 1 → 3 : 1 → 1 : 1 → 1 : 3 → CHCl₃ : MeOH = 10 : 1 → 7 : 1 → 5 : 1 → 3 : 1)를 실시하여 15개의 분획물(CTE1 - CTE15)을 얻었다. 그 중 ALP 활성에 가장 좋은 효과를 보이고 major 성분을 포함하고 있는 CTE11(933mg) 분획물을 silica gel c.c.(CHCl₃ : MeOH = 7 : 1)를 실시하여 9개의 분획물(CTE11-1 - CTE11-9)을 얻었고 그 중 CTE11-6(171mg)을 ODS c.c.(MeOH : H₂O = 1 : 2)로 정제하여 화합물 1(81mg)을 얻었다.

또 다른 주성분을 포함하고 ALP 활성에 좋은 효과를 보이는 CTE14(701mg) 분획물을 silica gel column chromatography(CHCl₃ : MeOH = 4 : 1)를 실시하여 8개의 분획물(CTE14-1 - CTE14-8)을 얻었고 그 중 CTE14-5(254mg)를 ODS c.c.(MeOH : H₂O = 1 : 2)로 정제하여 화합물 2(92mg)를 얻었다.

제 7 절 골강화 성분의 이화학적 특성

1. 이화학적 특성으로 농도활성 관계 (dose-response), 온도, pH에 따른 활성의 변화 등을 인간유래 세포주인 Saos-2를 대상으로 증식능과 효소활성도를 측정하였다. 홍화 추출물의 농도활성 관계 (dose-response)는 추출물의 농도를 1×10^{-8} mg/ml ~ 1mg/ml의 농도까지 활성의 변화를 조사하였다.

2. 활성추출물의 가공중 활성의 유지를 간접확인하기 위하여 온도별, 가열

시간별로 조골세포 증식능과 효소활성도를 측정하였다. 온도별로는 일반 조리과정에 준하여 60℃, 80℃, 100℃에서 10분간 정치하였으며, 가열시간별로는 100℃에서 2분~10분간 처리하였다.

3. 활성추출물의 체내활성을 추론하기 위하여 pH별 골세포 증식능과 활성도를 측정하였다. pH 처리는 위와 장의 pH를 기준하여 2, 7 및 10인 phosphate buffer solution에 2시간 동안 침지한 후 세척하고 동결건조 시료를 회석하여 사용하였다.

제 8 절 활성성분의 초임계 추출방법

1. 용매추출외에 골강화 활성성분의 또 다른 추출방법으로서 초임계추출을 시행하였다. 용매회수비용 절감, 성분보존성에서 장점으로 홍화의 활성성분 추출에 응용하고자 하였다. 시료를 원료 상태로 실린더에 정치시킨후 초임계유체(supercritical carbon dioxide)를 순환하여 추출하였다. 초임계유체는 50℃, 5000psi에서 CO₂를 2500L까지 순차적으로 회전하였으며 무게별로 7개의 추출 Fraction을 얻었다.

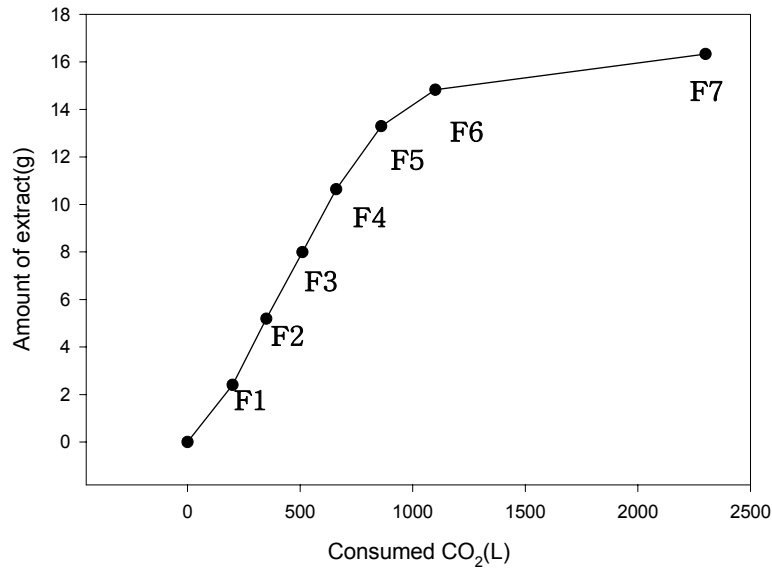


Fig. 3. Extraction of Safflower oil by supercritical carbon dioxide at 50 °C, 5000psi

2. 지방산의 분석

골세포 활성화 및 칼슘흡수 촉진인자로서 linoleic acid의 회수정도를 측정하기 위하여 각 fraction의 지방산 조성을 분석하였다. 지방산 함량은 gas chromatography로 분석하였으며 FID로 detector로 검지하였다.

3. 인지질 함량분석

조골세포 활성화에 기질물질인 인지질의 함량을 ICP(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer)를 활용하여 분석하였다. 시료를 묽은질산으로 전처리한 다음 탈이온수로 정용, 여과하고 여유도결합 플라즈마 원자방출 분광법으로 분석하였다. 원소의 표준용액의 농도는 0, 1, 10, 50 ppm로 조제하여 4점을 이용한 검량곡선을 작성하여 측정하였다.

제 9 절 발골시료의 무기질 분석

무기질 및 중금속의 전처리는 시료를 약 2~5 g을 도가니에 넣고 전열기에 서 예비 회화시킨 후 550 °C 전기회화로에서 2시간 태운 다음 방냉하였다. 여기에 탈이온수 10방울을 가해 재를 적시고 묽은 질산(1:1 HNO₃) 4 mL을 넣고 다시 전열기(120 °C)에서 수분을 날려보낸 다음, 550 °C 전기회화로에서 1시간 회화·방냉 후 묽은 염산(1:1 HCl) 10 mL로 녹여 이를 50 mL 정용 플라스크로 옮겨 탈이온수로 정용, 여과하여 유도결합 프라즈마 원자방출 분광법 (Inductively Coupled Plasma -Atomic Emission Spectrophotometer, Jobin Yvon JY138 Ultrace, France, 이하 ICP-AES로 함)으로 분석하였다. 실험에 사용된 증류수는 17 MΩ 이상 되는 탈이온수(NATO pure ultra system, Barnstead, USA)이었고, 이때 사용한 초자기구는 10% HNO₃ 용액에 하룻밤 담근 다음 꺼내어 수돗물로 세척한 후 탈이온수로 3번 이상 gpd군 것을 건조하여 사용하였다. 각 원소의 표준용액의 농도는 0, 1, 10, 50 ppm으로 조제하여 4점을 이용한 검량곡선을 작성하여 측정하였다. 이때 ICP-AES의 작동조건은 Table 3과 같으며, 각 표준물질은 High-Purity Standard사(USA) 제품을 사용하였다.

Table 3. ICP-AES의 작동조건

Power		1 Kw for aqueous
	Nebulizer pressure	3.5 bars for meinhard type C
	Aerosol flow rate	0.3 L /min
	Shealth gas flow	0.3 L /min
	Cooling gas	12 L /min
Wavelength(nm)	Na	589.592
	Ca	393.366
	Fe	238.204
	P	213.618
	Pb	220.353
	Cd	214.438
	Ge	209.426
	Se	196.090

제 10 절 활성추출물의 산화안정성

1. 시료

홍화씨는 경북 의성군에 소재한 우리 홍화인 영농조합에서 2003년에 수확한 홍화씨를 분말화하여 시료로 사용하였다. 홍화유 제조를 위해서는, 홍화씨를 볶는 과정에서 향산화성의 증대가 염려되어 볶음 과정을 생략하고 단순 압착에 의해서만 시료를 준비하였다. 실험에 사용된 향산화제 BHA, BHT, PG, α -tocopherol은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였으며, TBHQ는 Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

2. 활성추출물

홍화씨 분말시료에 80% 에탄올 용액 5배를 가하여 Magnetic stirrer(Model MS-2026, MS Instruments Co., Taiwan)에서 상온으로 하룻밤 균질화 시킨 후, Whatman No. 2과 No. 40으로 반복 여과하였다. 여액은 Rotary vaccum evaporator(Model HS-3000, Hahn Shin Instruments Co.,

Korea)를 이용하여 40℃ 이하에서 70~80 rpm으로 진공 농축하였다.

3. 자동산화에 의한 홍화유의 산화안정성 측정

자동 산화가 진행되는 동안 각종 항산화제의 효과를 알아보기 위하여 가속 저장 실험(Accelerated storage test)을 수행하였다. 항산화제 무첨가구를 대조구로 하여, BHA 0.02% 첨가구, BHT 0.02% 첨가구, TBHQ 0.02% 첨가구, PG 0.01% 첨가구, α -tocopherol 0.02% 첨가구의 6가지 시료를 크기가 일정한 1,000 mL 비이커에 일정량씩 담아 60℃ 항온기에 저장하면서 일정 간격으로 분취하여 사용하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균낸 값을 사용하였다.

3.1. 과산화물가

홍화유의 과산화물가는 A.O.C.S.의 방법에 따라 측정하였다. 홍화유 5 g을 250 mL 삼각 플라스크에 취한 후 chloroform/acetic acid(2 : 3, v/v)용액 30 mL을 가하여 용해시키고, 0.5 mL의 potassium iodide(KI)를 가하였다. 어두운 곳에서 10분간 방치시키고, 30 초간 세차게 흔들어 준 뒤 50 mL의 증류수를 가하고, 1% 전분용액을 지시약으로 0.01 N sodium thiosulfate 용액으로 적정하여 과산화물값을 산출하였다. 홍화유의 지방 산화 억제율은 다음 식에 의해 계산되었다.

$$100 - [(처리구의 POV \text{ 증가} / \text{대조구의 POV 증가}) \times 100]$$

3.2. 산가

홍화유의 산가는 식약청 식품공전에 기술된 방법에 따라 측정하였다. 홍화유 5 g을 250 mL 삼각 플라스크에 취한 후 ethanol/diethyl ether(1 : 2, v/v)용액 100 mL을 가하여 용해시킨 다음 페놀프탈레인 용액을 지시약으로 0.1 N potassium hydroxide ethanolic solution으로 엷은 홍색이 30 초간 지속될 때까지 적정하였다.

제 11 절 활성성분의 소재화 활용기술

1. 골강화 활성성분의 수용액내 분산

홍화의 경우 유지함량이 높은 등의 이유로 액상제품 개발이 없었다. 본 과제에서는 차기년도 골강화 가공품 가운데 액상제품 개발을 시도하기 위하여 사전 단계로서 골강화 활성성분이 포함된 추출물의 수용액내 분산조건을 예비 실험 하였다. 수용액내 분산을 위한 유화제로는 아라비안검, 가라기난, 자당 지방산에스테르를 0.1%~0.4% 까지 조합하며 사용하였다.

2. 유화제의 선정

수용액내 분산을 위한 유화제로는 아라비안검, 가라기난, 자당지방산에스테르를 0.1%~0.4% 까지 조합하며 사용하였다.

3. 분산도의 측정

수용액내 입자 분산성은 Formulaction사의 Turbiscan을 사용하여 광학적으로 분석하였다. 입자분산도(variation)와 부유(creaming), 침강(sedimentation)을 파장 back scattering의 역함수로 계산하였다. 역학적 지표의 함수는 다음과 같다.

$$BS \propto [1/\lambda^*]^{1/2}$$

$$\lambda^* = [2d/3\Phi(1-g)Q_s]$$

즉 빛이 반사하는 λ^* (이동경로)가 짧을수록 BS(backscattering) 값은 증가하며 creaming 및 sedimentation의 정도를 감지할수 있다. BS값이 작은 경우 이동경로가 크며 variation이 이루어져 있음을 감지할수 있다. BS값으로부터 BS의 변화(BS_t)와 creaming의 이동속도(migration velocity, V_t)를 판단하여 수용액내 분산상태를 파악하였다.

제 3-2장 연구개발 수행 결과

제 1 절 시료의 용매 추출 및 농축

1. 토종홍화와 외산(중국산) 홍화 비교

순수 국내산 토종 "홍화씨"의 효능이 알려지면서 수입산이 시장에 혼재되어 있다. 국내산과 수입산의 시료 특성을 비교하고 조골 활성을 비교하였다. 토종홍화의 특징은 씨알이 적으며 갈색을 띠고 외피에 윤기가 있다. 씨알의 배아부분은 적고 종피로부터 분리되어 있으며 씨알 선단부 색깔이 갈색이고 암수술 부착 또는 흔적이 있다. 씨알은 물에 뜨는 특징이 있으며 잎의 모양은 길고 엉덩퀴 모양이다. 잎과 꽃받침에는 가시가 많다. 반면에 수입홍화는 씨알이 굵고 색깔이 희며 씨알의 배아부분이 굵고 종피와 밀착되게 밀도가 높다. 씨알은 물에 가라앉으며 씨알 선단부 표면이 거칠면서 상하 색깔구분이 선명하지 않다. 잎은 둥글며 잎과 꽃받침에는 가시가 거의 없다. 그러나 동남아시아 수입홍화는 둥근모양을 하고 토종과 유사한 색깔을 띠기도 하며 구별이 난이한 경우도 있다.

2. 원료의 추출수율 및 성분특성

2.1. 시료의 농축 수율 및 농도

시료의 농축 수율 및 농도는 Table 4와 같다.

Table 4. Yield and concentration of safflower extracts.

Sample	Yield(%)	Concentration(Brix)
Safflower	14.82	24.0

농축 후 시료의 농축 수율은 원료 중량대비 14.82 %, 수용성 고형분 농도는 24 °Brix로 나타났다.

2.2. 시료의 성분특성

본 실험에 사용된 홍화의 일반성분 및 칼슘, 비질소 함량은 Table 5와 같다.

Table 5. Proximate compositions of safflower. Unit : %

Sample	Moisture	Lipid	Protein	Ash	NFE*
Raw safflower	0.73	2.51	4.56	2.87	89.33
Ethanol extraction	71.42	2.51	4.56	1.28	20.22

* NFE : nitrogen free extract(starch, NDF)

이 수분함량은 0.73%, 조지방은 2.51%, 조단백질은 4.56%, 회분은 2.87%로 나타났고, 전분과 난소화성 섬유가 포함된 비질소 추출물은 89.33%로 높은 함량을 보였다. 홍화의 에탄올 추출물의 경우는 수분함량이 71.42%, 조지방 2.51%, 조단백질 4.56%, 회분 1.28%로 나타났고, 비질소 추출물 함량은 20.22%를 보였다. 에탄올 추출물의 일반성분 및 NFE, 칼슘 등 무기질 함량은 난소절제한 실험쥐 사료 배합을 위한 기초자료로 활용하였다.

제 2 절 세포계 골강화 활성화 시스템 및 검색

1. 골 활성화 세포계 시험법의 구축 및 골강화 활성화 검색

1.1. 골관계 시험법의 구축

인간유래 세포계로써 Saos-2 세포와 MG-63를 배양하고 효소활성을 측정함으로써 동물실험 결과와 혈액지표의 세포내 활성을 확인할 수 있다. 세포계 시험계는 소량 투입으로 인하여 물질의 특성 규명 시 시스템으로도 이용할 수 있다. 세포계 시험을 통하여 중국산과의 활성 비교도 시행하였다.

1.2. 골강화 활성화 검색

1.2.1 Saos-2 cell을 이용한 세포 생존능 측정

인체 유사 조골세포주인 Saos-2 cell에 대해 sample의 세포증식능을 알아보기 위해 MTT assay로 검색하였다. Positive control의 세포생존과 증식능을 기본적으로 시험하였다. 1,25(OH)₂D₃ 와 NaF를 사용한 결과 1,25(OH)₂D₃는 10⁻⁸ mg/ml 농도에서 대조구의 97%를 나타내었으며 지표물질 (1,25(OH)₂D₃) 농도에 비례하여 세포 증식능이 증가하여 10⁻⁵ mg/ml 농도에서 113%로 높았고 10⁻⁴ mg/ml 농도에서 95%로 감소하였다. NaF는 대조구의 10⁻⁸ mg/ml 농도에서 대조구의 90%를 나타내었으며 지표물질 (NaF) 농도에 비례하여 세포 증식능이 증가하여 10⁻⁵ mg/ml 농도에서 95%를 보였고 10⁻⁴ mg/ml 농도에서 124%로 높았다. (Fig. 4).

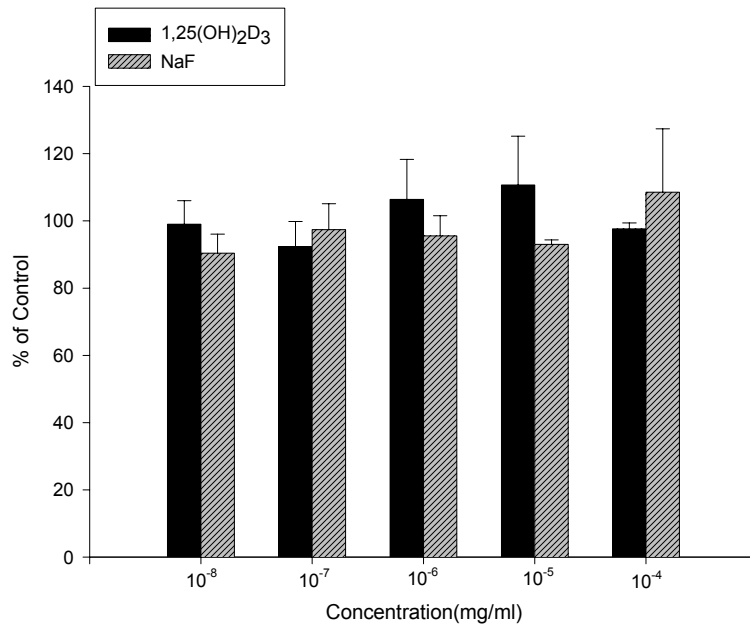


Fig. 4. Cell proliferation effects of 1,25(OH)₂D₃ and NaF on Saos-2, human osteoblast-like cells.

국산과 중국산 홍화의 세포증식효과를 Saos-2 cell을 이용하여 비교하였다(Fig. 5). 국산 홍화는 1×10⁻⁸ mg/ml부터 대조구 대비 100% 증식능으로 정제시약인 1,25(OH)₂D₃, NaF 등 Positive control보다 세포증식능이 안정적으로 우수하였다. 국산 홍화는 1×10⁻⁸ mg/ml~1×10⁻⁵ mg/ml에서 대조구의 100%~108%를 나타내었으며 10⁻⁴ mg/ml에서 113%로 증가하였고 10⁻¹ mg/ml 농도에서 증식률 135%로 높았다. 중국산 홍화는 농도 1×10⁻⁴~1×10⁻² mg/ml에서 115%, 10⁻³ mg/ml 농도에서 130%의 세포증식효과를 나타내었으나 10⁻² mg/ml 농도에서 100%로 감소하였고 1×10⁻¹ mg/ml 농도에서는 대조구 대비 40%로 급격 감소하여 높은 세포독성을 나타내었다. 양국의 홍화는 농도에 따라 증식능이 증가하는 유사경향을 나타내기도 하였으나, 국산홍화가 중국산과 비교하여 독성이 낮을뿐 만 아니라 세포 증식 효과도 상대적으로 다소 우수하였고 세포증식률이 농도 증가에도 지속적으로 유지되는 것으로 나타났다.

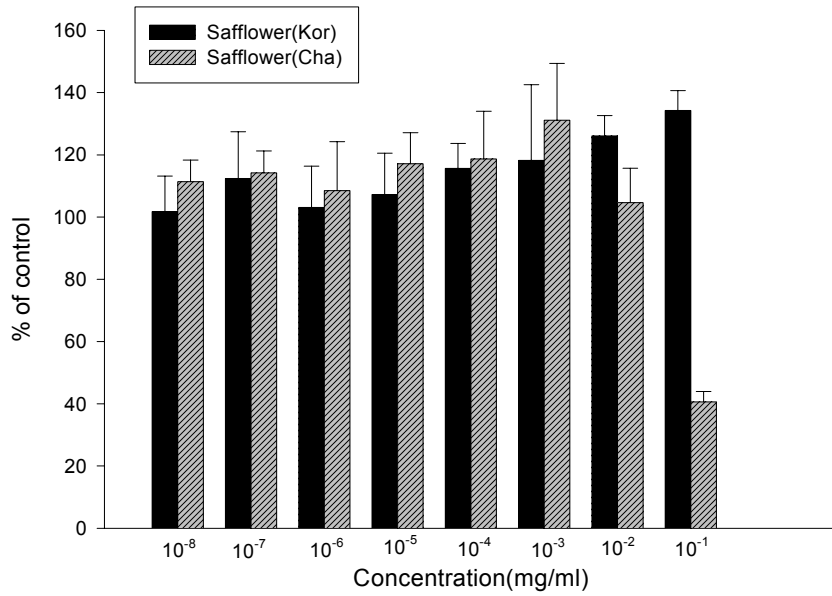


Fig. 5. Cell proliferation effects of safflower extracts on the Saos-2, human osteoblast-like cells.

1.2.2 MG-63 cell을 이용한 세포 생존능 측정

Saos-2와 교차 검색을 위해 또하나의 인간 유사 조골세포주인 MG-63 cell에 대해 sample의 세포증식능을 검색하였다.

Positive control로서 1,25(OH)₂D₃ 와 NaF를 사용한 결과 1,25(OH)₂D₃는 1×10⁻⁷, 1×10⁻⁸ mg/ml 에서 대조구의 104%, 113%의 세포증식능을 보였으나 농도 증가에 따라 감소하여 1×10⁻⁶ mg/ml 농도에서, 대조구의 80%, 1×10⁻⁴~1×10⁻⁵ mg/ml 농도 에서는 대조구의 70%를 나타내어 20%~30% 정도 세포독성 나타내었다. NaF의 경우에는 모든농도에서 대조구의 100% 이상의 세포 증식능을 보였고 1×10⁻⁴~1×10⁻⁶ mg/ml 농도에서는 120% 이상의 높은 세포증식능을 보였다(Fig. 6).

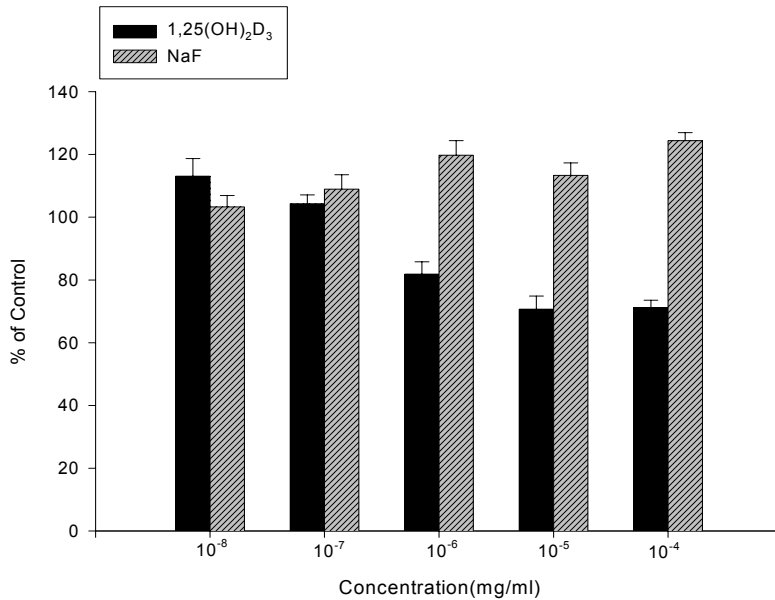


Fig. 6. Cell proliferation effects of 1,25(OH)₂D₃ and NaF on MG-63, human osteoblast-like cells.

국산과 중국산 홍화의 세포증식효과를 MG63 cell을 이용하여 비교하였다(Fig. 7). 국산 홍화는 모든농도에서 대조구 대비 100% 이상의 증식능을 보였다. 국산홍화의 경우 1×10⁻⁸~1×10⁻⁵ mg/ml 농도에서 대조구 대비 115% 증식능을 나타내었으며 1×10⁻⁴~1×10⁻³ mg/ml 농도에서 대조구의 10

2%~109% 정도의 증식능을 보였으나 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-1}$ mg/ml 농도에서 대조구의 110%~125%로 증식능이 높았다. 반면 중국산 홍화는 1×10^{-1} mg/ml 농도에서 대조구의 128%를 나타내기도 하였으나 전반적으로 국산홍화보다 증식능이 낮았다. 중국산 홍화 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$ mg/ml 농도에서 대조구 대비 100% 정도의 증식능을 나타내었으며 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4}$ mg/ml 농도에서는 대조구보다 낮은 92%~94% 정도의 증식능을 보였고 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2}$ mg/ml 농도에서 103%~115% 증식능을 나타내었다. 인간유사세포에서 교차 검증결과 MG63, Saos-2 cell에서 공통적으로 국산홍화가 중국산에 비해 독성이 없으며, 세포증식능이 우수한 것을 알 수 있었으며 이는 중국산과의 품종차이 및 토질 등 재배환경의 차이에 기인한 것으로 판단하였다.

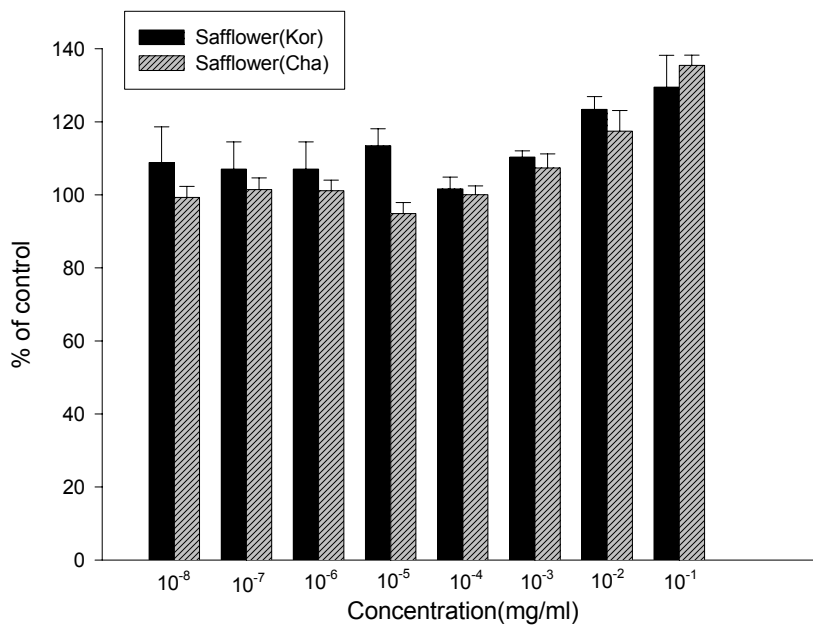


Fig. 7. Cell proliferation effects of safflower extracts on the MG-63, human osteoblast-like cells.

1.2.3. 골세포에서의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

Alkaline phosphatase(ALP)는 동물계 혈액시스템과 동일하게 조골세포의 활성을 나타내는 지표로 사용된다. 조골세포에서 ALP의 활성을 증가시키는 것으로 보고된 1,25(OH)₂D₃와 NaF를 positive control로 사용하였다. 1,25(OH)₂D₃는 1×10⁻⁴~1×10⁻⁷ mg/ml 농도에서 대조구의 131%~155% ALP 활성 증가를 보였고, 1×10⁻⁸ mg/ml 농도에서 대조구의 168%의 높은 ALP 활성 증가를 나타냈다. NaF는 1×10⁻⁵~1×10⁻⁸ mg/ml 농도에서 대조구의 115%~145%의 활성 증가를 보였고, 1×10⁻⁴ mg/ml 농도에서 대조구의 155%의 높은 활성 증가를 보였다.(Fig. 8)

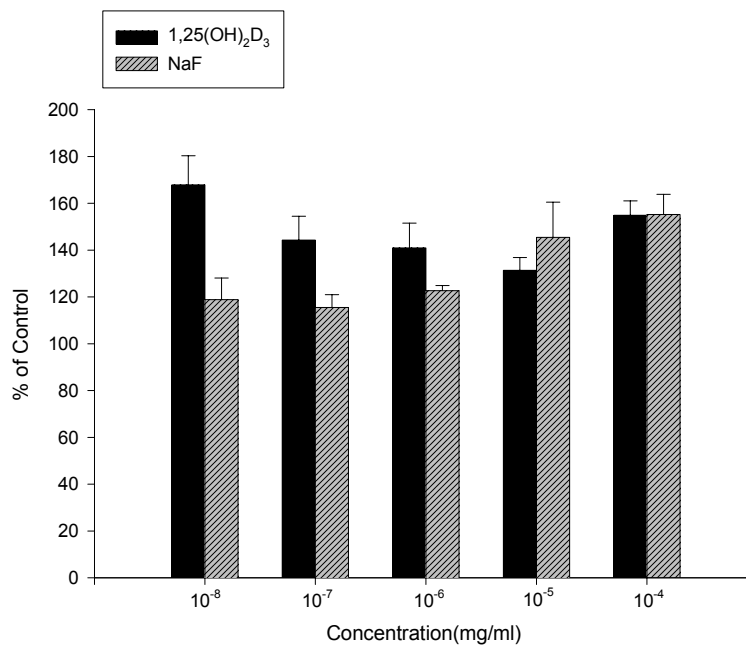


Fig. 8. Alkaline phosphatase(ALP) activities of 1,25(OH)₂D₃ and NaF on Saos-2, human osteoblast-like cells.

국산 홍화는 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$ mg/ml 농도에서 ALP 활성이 증가하여 1×10^{-6} mg/ml 농도에서 대조구의 127%로 최고값을 보였으며 Positive control 과 유사하였다. 국산홍화는 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-2}$ mg/ml 농도까지 100%~115%의 ALP 활성을 유지하였다. 중국산 홍화는 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-6}$ mg/ml 농도에서 대조구의 107%~110%의 ALP 활성 증가를 보였으나 기타 농도에서는 대조구의 100% 미만의 활성을 보였다(Fig. 9).

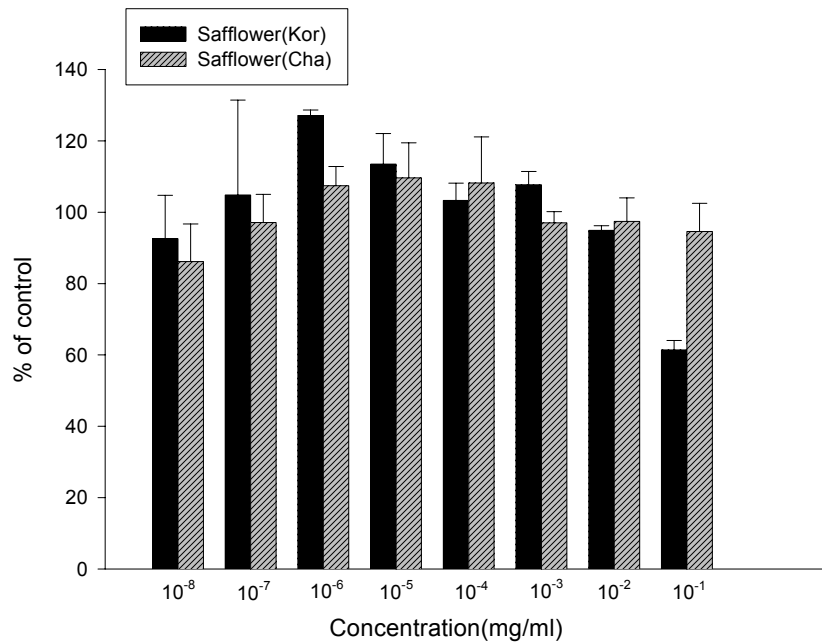


Fig. 9. Alkaline phosphatase(ALP) activities of safflower extracts on the Saos-2 cell, human osteoblast-like cells.

2. Calvarial cell에 의한 홍화시료의 독성 및 조골활성 시험

쥐(rat)의 자궁의 fetus 후두부로부터 calvarial cell을 준비하고 홍화 시료의 세포독성과 조골세포 증식능을 시험하였다.

Table 6. MTT assay of safflower extracts on the rat calvarial cells.

Sample	Survival rate %
NC ¹⁾	100.0 ± 2.8
HH1	102.3 ± 3.2
HH10	103.1 ± 4.3

¹⁾ NC (normal control)

Calvarial cell의 MTT assay에 의한 HH1, HH10 두농도 처리구에서 100% 이상의 생존률을 나타내어 홍화에 의한 직접적인 세포 독성은 없는 것으로 판단되었으며 상기의 인간유래 세포의 경향과도 일치하였다.

2.1 골세포의 증식능 측정

Calvarial cell에 대한 홍화 추출물의 증식효과는 Table 7과 같다.

Table 7. Cell proliferation effects of safflower extracts on the rat calvarial cells.

Sample	Proliferation %
NC ¹⁾	100.0 ± 2.8
HH1	137.8 ± 6.7
HH10	145.7 ± 11.4

¹⁾ NC (normal control)

HH1, HH10 처리구에서 대조구 대비 138%~146%의 세포 증식효과를 보여 홍화에 의한 골세포 증식이 양호하였다. 임신한 쥐 calvarial cell의 세포 증식 효과는 인간유래 세포의 경향과도 일치한 결과를 나타내었다.

2.2 Collagen 합성량 측정

조골세포는 골 기질물질인 골단백질을 생산하여 골형성을 유발한다. 홍

화의 Collagen 합성활성은 Table 8과 같다.

Table 8. Collagen synthesis effects of safflower extracts on the rat calvarial cells.

Sample	collagen (ug/g protein)
NC ¹⁾	103.2 ± 7.2
HH1	118.2 ± 9.3
HH10	132.4 ± 8.7

¹⁾ NC (normal control)

세포에 홍화시료를 처리한 결과, 대조구의 103 ug/g protein과 비교하여 HH1 및 HH10에서 118 ug/g protein ~ 132 ug/g protein으로 collagen 합성을 유의성있게 증가시켰다. 홍화시료는 골 기질물질의 특이 단백질인 collagen의 생합성을 촉진하여 골 형성에 도움이 될 것으로 고려하였다.

3. 파골세포 억제활성

홍화의 파골세포억제 활성을 precursor의 억제활성과 multinucleate 분화억제로 나누어 조사하였다(Table 9).

Table 9. Inhibition rate of Safflower extract on the osteoclast cell differentiation

Conc.(ug/ml)	Inhibition of precursor cell differentiation (inhibition%)	Inhibition of multinucleate cell differentiation (inhibition%)
100	0	0
50	0	0
25	79.5	99.8
1	24.1	39.5

홍화 추출물은 1ug/ml, 25ug/ml에서 24.1%, 79.5%의 precursor cell 억제활성을 나타내었으며 39.5%, 99.8%의 multinucleate cell 분화억제 활성을 나타내었다. 50ug/ml 이상의 농도에서는 세포 stress 등의 영향으로 파골세포 억제활성이 나타나지 않았다. 파골세포 억제활성은 25ug/ml의 농도에서 최고 활성을 나타내었다. 홍화추출물은 Osteoblast 및 stromal cell 세포막의 RANKL(the soluble receptor activator of NF- κ B ligand)와 OPG(osteoclast progenitor의 RANK-osteoprotegerin)의 상호작용보다는 multinucleate cell의 분화에 대한 억제활성이 높은 것으로 검색되었다.

제 3 절 활성성분의 세포내 유전자 발현 특성

1. Vitamin D₃ 수용체의 발현에 미치는 영향

골세포에서 Vitamin D₃ 수용체의 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다(Fig. 10).

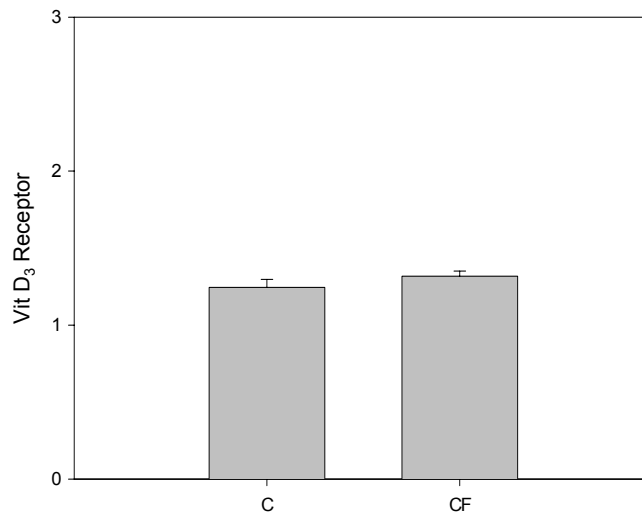


Fig. 10. Effect of CF on Expression of Vitamin D₃ Receptor Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated

into mRNA. C: Vehicle CF: 50ug/ml of CF Extract

대조군의 유전자 양은 1.24 ± 0.05 이었으며, 홍화를 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 1.317 ± 0.033 로 CF는 Vitamin D₃ 수용체 유전자 발현에 유의적인 영향을 주지 못했다.

2. PTH receptor 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 PTH receptor 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다(Fig. 11).

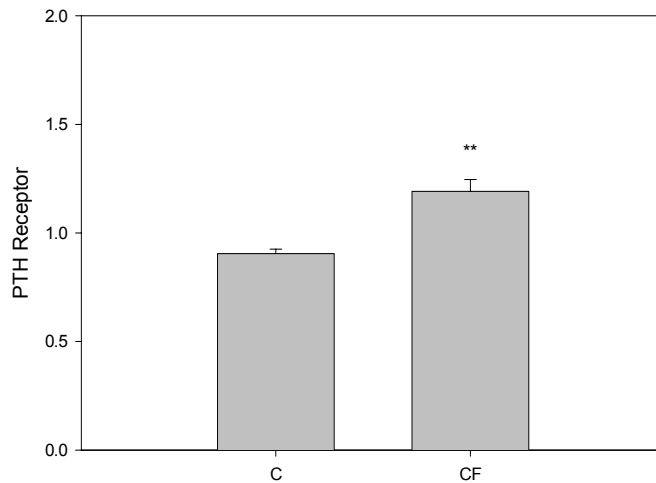


Fig. 11. Effect of CF on Expression of Parathyroid Hormone(PTH) Receptor Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA. C: Vehicle CF: 50ug/ml of CF Extract **: $p < 0.01$ vs C

대조군의 유전자 양은 0.905 ± 0.02 이었으며, 홍화를 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 1.191 ± 0.054 로, CF는 PTH Receptor 유전자 발현을 현저히 증가시켰다.

3. Calcitonin 수용체 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 calcitonin receptor 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다(Fig. 12).

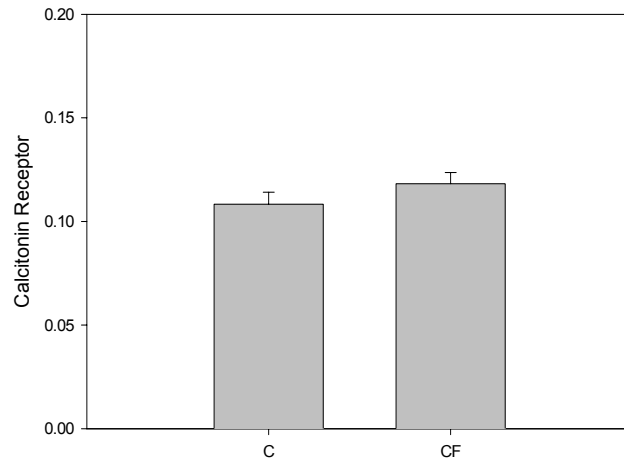


Fig. 12. Effect of CF on Expression of Calcitonin receptor Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA. C: Vehicle CF: 50ug/ml of CF Extract

대조군의 유전자 양은 0.108 ± 0.0058 이었으며, 홍화를 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 0.118 ± 0.0054 으로, 홍화는 calcitonin Receptor 유전자 발현을 현저히 억제하였다.

4. PKA(Protein Kinase A) 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 PKA 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다(Fig. 13).

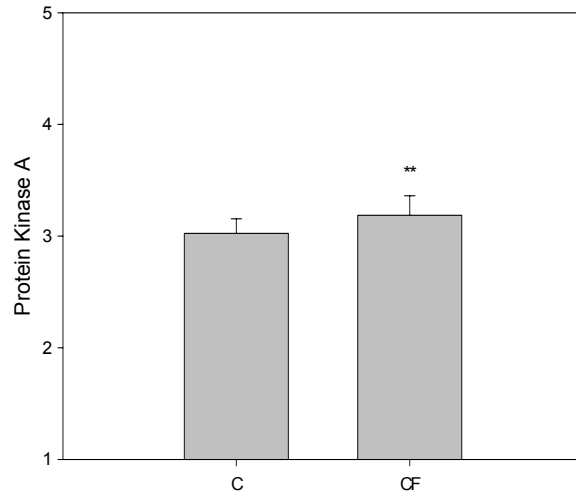


Fig. 13. Effect of CF on Expression of Protein Kinase A Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA. C: Vehicle CF: 50ug/ml of CF Extract **: p<0.01 vs C

대조군(C)의 유전자 양은 3.022 ± 0.131 이었으며, 홍화를 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 3.185 ± 0.175 으로, 홍화는 PKA 유전자 발현을 유의적으로 증가시켰다.

5. PKC(Protein Kinase C) 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 PKC 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 양을 측정하여 결정하였다(Fig. 14).

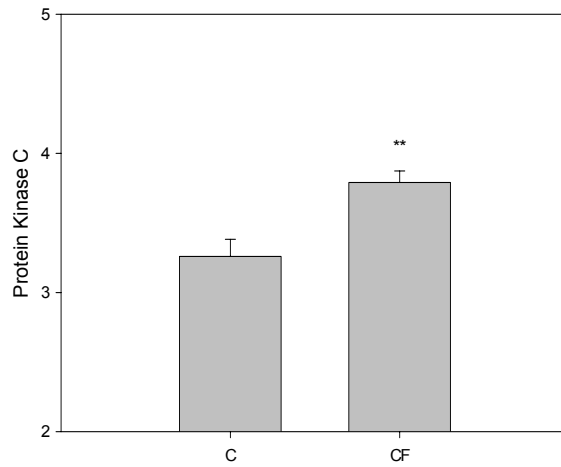


Fig. 14. Effect of CF on Expression of Phospholipase A₂ (PLA₂) Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA. C: Vehicle CF: 50ug/ml of CF Extract *: p<0.05 vs C

대조군(C)의 유전자 양은 3.259 ± 0.123 이었으며, 홍화를 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 3.791 ± 0.082 으로, 홍화는 PKC 유전자 발현을 현저히 증가시켰다.

6. PLA₂ (phospholipase A₂) 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 PLA₂ 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence량을 측정하여 결정하였다(Fig. 15).

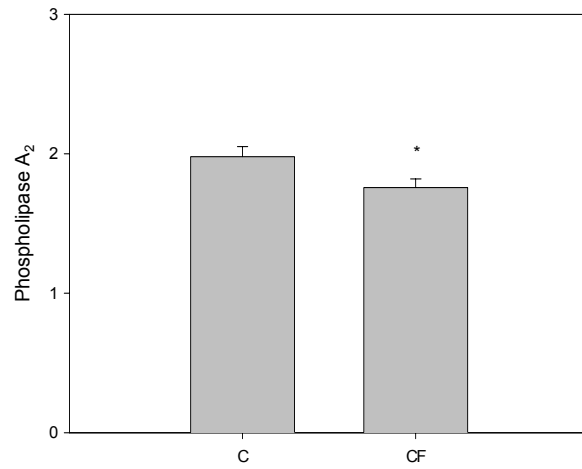


Fig. 15. Effect of CF on Expression of Phospholipase A₂ (PLA₂) Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.

C: Vehicle

CF: 50ug/ml of CF Extract

*: p<0.05 vs C

실험결과, 대조군의 유전자 양(C)은 1.979 ± 0.072 이었으며, 홍화를 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 1.758 ± 0.062 로, 홍화는 PLA₂ 유전자 발현을 억제하였다.

7. COX (cyclooxygenase) 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 COX 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence량을 측정하여 결정하였다(Fig. 16).

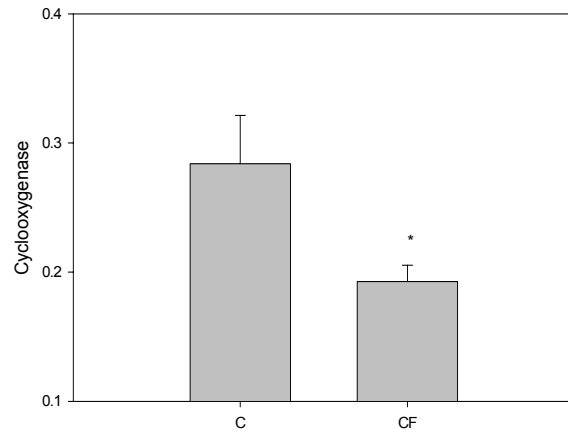


Fig. 16. Effect of CF on Expression of Cyclooxygenase(COX) Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.

C: Vehicle

CF: 50ug/ml of CF Extract

*: $p < 0.05$ vs C

실험결과, 대조군의 유전자 양(C)은 0.145 ± 0.0098 이었으며, 홍화을 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 0.095 ± 0.0037 로, 홍화는 COX 유전자 발현을 현저히 억제하였다.

8. PGE₂ (Prostaglandin E₂) synthase 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 PGE₂ 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence량을 측정하여 결정하였다(Fig. 17).

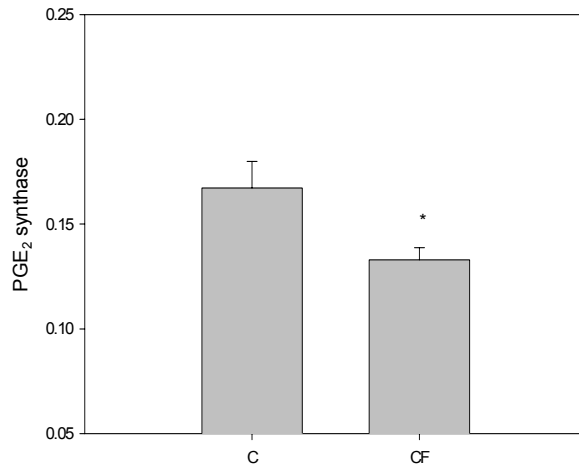


Fig. 17. Effect of CF on Expression of Prostaglandin E₂(PGE₂) Synthase Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.

C: Vehicle

CF: 50ug/ml of CF Extract

*: p<0.05 vs C

실험결과, 대조군의 유전자 양(C)은 0.167 ± 0.012 이었으며, 홍화을 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 0.133 ± 0.0058 로, 홍화는 PGE₂ 유전자 발현을 유의하게 억제하였다.

9. Prostacyclin synthase 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 Prostacyclin synthase 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다(Fig. 18).

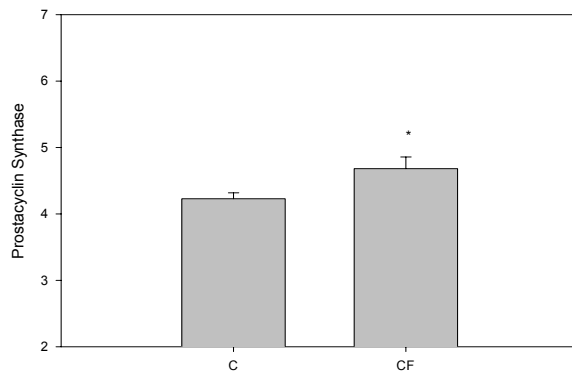


Fig. 18. Effect of CF on Expression of Prostacyclin Synthase Gene in MG-63 Cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.

C: Vehicle

CF: 50ug/ml of CF Extract

*: $p < 0.05$ vs C

실험결과, 대조군(C)의 유전자 양은 4.228 ± 0.088 이었으며, 홍화을 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 4.68 ± 0.176 로, 홍화는 prostacyclin synthase 유전자 발현을 현저히 증가시켰다.

10. Collagen 유전자 발현에 미치는 영향

골세포에서 Collagen(type IV) 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence 량을 측정하여 결정하였다(Fig. 19).

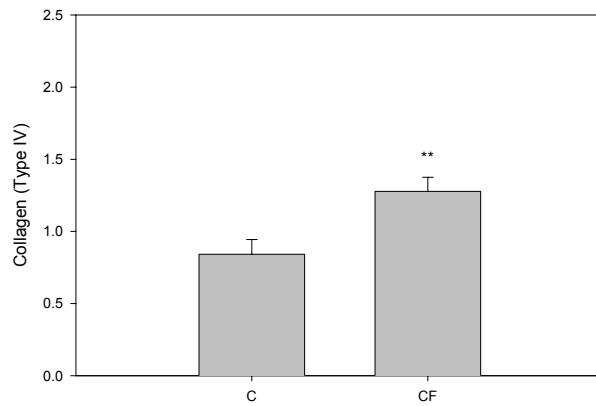


Fig. 19. Effect of CF on Expression of Collagen(type IV) Gene in MG-63 cell-line. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy incorporated into mRNA.

C: Vehicle

CF: 50ug/ml of CF Extract

** : $p < 0.01$ vs C

실험결과, 대조군(C)의 유전자 양은 0.841 ± 0.102 였으며, 홍화을 첨가하여 배양한 군(CF)에서 얻은 유전자의 양은 1.277 ± 0.097 로, 홍화는 collagen type IV 유전자 발현을 현저히 증가시켰다.

11. 유전자에 대한 영향의 해석

홍화가 골세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MG-63를 배양하여 유전자 검색 실험을 하였다. 조골세포의 PLA₂는 Vitamin D₃, PTH, Calcitonin등의 자극에 의해 활성이 증가하여 세포막의 인지질로부터 AA를 유리하며, AA는 대사과정을 거쳐 생성되는 다양한 prostaglandin류를 통하여 조골세포와 파골세포의 기능을 조절함으로써 골대사에 관여한다. PLA₂는 protease와 endonuclease의 활성을 증가시켜 골기질 물질의 분해와, DNA 破壞를 통하여 골의 재흡수를 誘發한다. 또한, 골흡수를 촉진하는 Prostaglandin 류를 생합성하여 골다

공증을 심화시키는 것으로 보고되었다. 研究結果, 홍화는 칼슘 依存的인 PLA₂의 유전자 발현을 억제하여, 뼈기질 물질의 파괴를 통한 골손실에 抑制效果가 있을 것으로 判斷되었다. PLA₂ 작용으로 遊離된 AA는 COX-1과 COX-2를 통하여 prostaglandin endoperoxide를 생성한다. AA로부터 생성된 Pendoperoxide 류는 脂質의 peroxidation을 유발하고 caspase pathway를 통해 각종 細胞의 apoptosis를 誘發한다. 本 實驗에서 홍화가 조골세포의 COX 유전자 발현에 미치는 영향을 측정한 결과, 抑制作用을 나타내었다. PGE₂의 생성 및 조골세포(OB) 및 파골세포(OC)의 분화 및 기능 활성화에 미치는 영향을 나타내고 있다. PGE₂는 OC의 분화에 중요한 역할을 하는 PKC의 활성화와 MAPK의 활성 증가시키고, G-protein에 연계된 Adenylate Cyclase를 활성화시켜 cAMP-dependent PKA의 활성을 증가시키며, OC에서 cAMP에 의존적인 collagen을 분해하는 MMP의 유전 발현을 촉진하여 골의 재흡수에 관여한다. 실험결과, 홍화는 PGE₂ synthase 유전자 발현을 억제하여 OC의 기능을 억제할 것으로 판단되었다. 이와는 별도로 prostacyclin은 cAMP에 의존적인 PKA의 작용을 통하여 OB의 MAPK를 활성화시키며, OB내의 cAMP의 증가는 bone ALP 및 osteocalcin의 합성증가를 유도하며 OB의 분화와 증식에 관여하고 있다. 또한, prostacyclin은 OB의 기능활성화 결과, 골기질의 형성을 유도하는 BMP (bone morphogenetic protein) 발현이 증가와 collagen 합성을 증가시킨다. 실험결과, 홍화는 PKA와 PKC, collagen 유전자 발현을 증가시켰으며, 또한 1차 배양된 랫드의 두개골 세포로부터 collagen생합성과 ALP 유전자 발현과 단백질 합성을 증가시켰으며, 또한, bone mineralization도 증가시켰다. 그러나, prostacyclin은 OB의 분화와 기능활성화를 자극하고 OC의 분화와 OC로부터 MMP 유전자 발현을 억제하여 골의 재흡수를 차단할 수 있다고 보고되었다. 홍화는 prostacyclin synthase의 發現을 增加시켜 PGI₂의 生成을 增加시킬 것으로 판단되었다. 따라서, 홍화는 cAMP을 증가시키며 PKA의 活性를 통해 造骨細胞의 기능을 활성화 시키며 破骨細胞의 기능을 抑制하며, 骨의 재흡수로 인한 골다

공증의 치료 및 예방에 사용될 수 있을 것으로 고려되었다. 이상으로부터 홍화는 프레드니솔론으로 減少한 조골세포의 분열능 및 기능을 增加시킬 수 있는 것으로 평가되었으며, 이는 파골세포(OC)의 분화와 기능을 활성화시키는 유전자의 발현을 억제하고, 조골세포(OB)의 분화와 기능을 활성화시키는 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 사료되었다.

제 4 절 동물계 골강화 활성 시스템 구축

1. 동물계 골강화 활성 시스템 구축

1.1. 골강화 활성을 측정할수 있는 시험계로는 세포계와 실험동물을 이용하는 방법이 있다. 각 시험계는 활성을 나타내는 대사방식에서 각기 다른 특성을 나타내므로 대상시료인 홍화의 골강화 활성을 명확하고도 다각적으로 평가하기 위하여 난소절제 흰쥐, 수평아리 및 세포계 등을 활용하여 교차검증 하였다.

1.2. 수평아리를 활용한 시험계의 구축

수평아리를 이용한 시험계의 경우 보편적으로 사용은 하지 않으나, 단일한 유전체보의 확보가 가능하여 실험결과의 유의차를 줄일 수 있으며 성장속도가 빨라 골약화 및 강화 현상이 명확히 검색될 것으로 판단하여 시스템을 개발하였다. 사료의 무기질 조절에 의한 골연화를 유발하고 홍화 추출물의 투여에 의하여 골강도의 변화를 추적할 수 있다. 흰쥐의 경우와 비교하여 호르몬의 영향 보다는 세포내 무기질의 강화현상을 판단할 수 있다. 골의 연화 유도 시험계는 저칼슘 식이의 방법을 선택하였으며 칼슘 15% 이하는 지나친 다리관절 부실 및 기본적 운동량 감소에 따라 폐사가 유발되었다. 따라서 저칼슘 식이 모델은 골다공증을 다소 유발하면서 운동량의 변화와 폐사율이 발생치 않는 칼슘 농도 30% 식이군으로 설정하였다. 예비 사양기간에는 일반사료를, 본사양 기간에는 저칼슘 사료를 급여하였으며 시료 첨가시에는 시료로

부터 유래한 무기질 함량을 보정하였다. 사료는 NRC 표준에 따라 배합하였으며 보정시는 에너지 변화를 최소화하기 위하여 셀룰로오스 함량을 조절하여 대치하였다. 인의 경우는 요구 수준을 충족하였다. 실험군은 골연화를 유도한 대조군, 홍화시료 처리군으로 구성, 3주간 사양하고 시험계를 개발을 완성하였다.

1.3. 난소절제 흰쥐를 활용한 시험계의 구축

난소를 절제한 암컷 흰쥐는 홀몬대사의 변화에 의하여 칼슘등 무기질이 골조직 내에서 감소하면서 골다공증이 유발된다. 골다공증을 유발한 흰쥐의 골다공증 억제효과로부터 홍화의 골강화 활성 판단이 가능하다. 골다공증 유발 시험계의 경우 여성의 폐경기 이후 호르몬 변화에 의한 골약화 억제효과를 간접적으로 판단할 수 있다. 실험동물은 6주령 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 입식한 후 평균체중이 200g이상으로 사양하고 난소적출 등 개복수술을 실시하였다. 난소적출은 12주령에 시행하였고 요각으로 부터 10~15mm전방, 척추로부터 15~20mm 하방부위의 피부를 10~15mm정도 절개한 다음 복벽을 5~7mm정도 근섬유의 방향으로 절개하여 난소를 노출시켰다. 난관-자궁접합부에서 혈관이나 지방조직을 함께 결찰하고 난소를 절제한 후 자궁과 지방조직을 복강내로 밀어 넣어 복벽과 피부를 봉합하였다. 절개부위는 염증방지를 위하여 페니실린으로 도포하고 회복시키면서 물과 사료를 급여하였다. 사양을 통하여 골약화를 유도하고 시험계 구축을 완료하였다. 실험군은 위군(sham group), 난소적출한 대조군(control group), 난소적출하고 홍화 실험사료를 급여한 홍화군(safflower group) 등 총 3개 실험군으로서 6주간 일반사양 (*ad libitum*)을 하였다.

제 5 절 홍화의 동물시험계 골강화 활성 검색

1. 저칼슘 식이 수평아리 시험계에서 홍화의 골강화 효과

1.1 체중 변화

골다공증은 실제로 폐경이 지난 여성뿐만 아니라 일반인에게도 저칼슘식으로 인해 빈번히 발생할 수 있는 질환이다. 어린 수평아리에게 저칼슘 사료를 급여하여 골다공증의 영향을 시험할 경우 저칼슘 식생활을 한 사람의 골대사에 미치는 영향과 비교될 수 있다. 수평아리의 경우 성장속도가 높아 시료에 의한 골의 변화를 관측하기 위한 시험계로서 유용하다. 저칼슘식에 건조상태의 시료 추출물을 식이섭유소 첨가량과 대체하여 3%를 첨가하고 골격성장에 미치는 영향을 조사하였다(Table 10).

Table 10. Values of weight gain and feed efficiency of chick fed low-calcium diets containing safflower for 3 weeks Unit : g/bird

Treatment	Initial body weight (g/bird)	body weight (g/bird)	weight gain (g/bird)	Feed intake (g/bird/day)	Feed/gain
Control	163.8±1.1	348.2±4.5	184.4±4.0	25.9±0.7	1.98±0.01
Safflower	165.9±0.4	366.2±7.5	200.3±7.7	26.9±1.1	1.89±0.03

실험사료 급여 사양시험 결과를 증체량에 대한 사료 급여율로서 조사하였다. 초기 실험동물(수평아리)의 중량은 대조구와 홍화처리구가 각각 163.8±1.1g, 165.9±0.4g 으로서 오차범위내에서 동일하였다. 사양후 중량은 대조구가 348g, 홍화처리구가 366g으로서 홍화처리구가 높았다. 증체량은 대조구 184.2g에 비해 홍화군이 200.3g으로 높게 나타났고, 사료 섭취량 또한 대조구 25.9g에 비해 26.9g으로 높게 나타났으나 증체량에 대한 사료 급여율에서는 홍화군(1.89)이 대조구(1.98)보다 다소 낮게 나타나 식이 효율이 높은 것으로 보였다.

1.2. 경골의 길이, 두께 및 무게

칼슘식을 조절한 수평아리의 3주간 사양 후 경골의 길이, 무게, 중앙부위의 두께를 측정된 결과는 Table 11과 같다.

Table 11. Tibial length, thickness, weight of chicks fed low-calcium diets containing safflower for 3 weeks¹⁾

Treatment	Total length(mm)	Thickness(mm)	Weight(g)	Weight(g)/Length(mm)
Control	60.08±1.85 ^a	4.25±0.27 ^a	1.824±0.19 ^a	0.030±0.003
Safflower	60.59±1.49 ^a	4.38±0.48 ^{ab}	1.984±0.26 ^b	0.033±0.003

¹⁾ All values are expressed as mean of 10 chicks, expressed as mean ± SD

경골의 길이는 홍화처리구가 60.59mm로 대조구 60.08mm 보다 다소 높았으며 경골의 두께와 무게도 대조구와 비교하여 다소 높은 것으로 나타났다. Estrogenic compound가 다량 존재할 경우 골형성은 촉진하나 성장방해 효과도 동시에 있는 것으로 알려져 있어 골형성과 동시에 길이, 두께에서는 다소 억제되었을 수 있다. 이는 세포분화 측면에서 교차검증이 필요한 것으로 판단하였다. 길이에 대한 무게의 비율은 대조구의 0.0304g과 비교하여 홍화구가 0.033g으로 다소 높게 나타나 무기질의 침착효과가 있었던 것으로 고려되며 흰쥐 시험계의 경우와 비교하여 성장성을 나타내었다.

1.3. 경골의 breaking strength, max. displacement, elastic stiffness 및 total stiffness

칼슘 식이를 조절한 수평아리의 3주간 사양후 breaking strength, maximum displacement, elastic stiffness 및 total stiffness를 측정한 결과는 Table 12.과 같다.

Table 12. Breaking strength, max. displacement, elastic stiffness, and total stiffness of chicks fed low-calcium diets containing various herbal medicines for 3 weeks¹⁾

Treatment	Max. displacement (mm)	Breaking strength(N)	Elastic stiffness (N/mm)	Total stiffness (N/mm)
Control	1.68 ^a ± 0.10	34.83 ^a ± 4.64	40.50 ^a ± 4.65	20.74 ± 3.74
Safflower	1.68 ^a ± 0.09	36.89 ^b ± 0.09	42.78 ^b ± 5.17	22.46 ± 3.12

¹⁾ All values are expressed as mean of 10 chicks, expressed as mean ± SD
Means with different superscript in the same column are different (p<0.05)

골의 물리, 화학적 구조가 발달하였을 경우 organic matrix에 hydroxyapatite가 침착되며 뼈에 가해지는 stress에 대한 저항성은 강해진다. 골의 강도나 밀도는 뼈에 가해지는 breaking strength(N)와 힘을 견디는 이동 거리(mm)의 상관성으로부터 해석할 수 있다. 대조구의 breaking strength (BS) 34.83N, Maximum displacement(MD) 1.68mm와 비교하여 홍화 처리구의 경우 MD는 1.68mm로 대조구와 같으나 BS가 36.89N로 높아 골의 organic matrix 발달에 효과가 있는 것으로 판단하였다.

Elastic stiffness도 대조구 40.5N/mm과 비교하여 홍화처리구는 42.8N/mm로 높았으며 total stiffness는 대조구 20.7N/mm과 비교하여 홍화구는 22.5N/mm로 높게 나타나 elastic stiffness와 동일한 경향을 나타내었다.

1.4. 수평아리의 혈액 지표인자 분석

1.4.1. 혈청단백질, 알부민, 총콜레스테롤 및 총지질량

혈청내 혈청단백질, 알부민, 총콜레스테롤 및 총지질 변화는 Table 13과 같다.

Table 13. Values of protein and lipid in serum of chick fed low-calcium diets containing sample for 3 weeks

Treatment	Total Protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	Total Cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Control	2.5±0.3 ^a	1.5±0.2 ^a	136.6±15.7 ^a	31.3±6.8 ^a
Safflower	2.7±0.3 ^{ab}	1.6±0.2 ^{ab}	139.2±19.5 ^{ab}	26.8±3.9 ^b

총단백질량은 대조구 2.5 g/dl에 비하여 홍화처리구가 2.7 g/dl로 다소 높은 것으로 나타났다. 혈청내 총단백질의 증가는 골형성에 효소 및 면역 단백질 등이 관계하는 경우를 고려할 때 골다공증에 유효한 것으로 추론할 수 있다.

Cholesterol 함량은 대조구 136.6 mg/dl에 비해 홍화처리구 139.2 mg/dl로 높은 경향을 나타내어 흰쥐의 경우와 일치하였다. 이는 천연물 제재의 첨가효과가 골다공증 억제 관련 호르몬상에 변화를 유도한 것으로 추정되었다. 일반적인 경우와 달리 Triglyceride(TG) 함량은 대조구의 31.3 mg/dl와 비교하여 26.8 mg/dl로 낮아 Cholesterol 함량과 비례하지 않았으며 역시 흰쥐의 경우와 일치하였다. 이는 동물성 기질과 달리 식물성 기질의 급여에서 기인한 것으로 판단하였다.

1.4.2 혈청내 Total Bilirubin, ALT, AST 및 GGT 활성

시료 급여시 생체내 독성효과를 간기능과 관련된 효소활성으로 분석한 결과는 Table 14와 같다.

Table 14. Values of Bilirubin, ALT¹⁾, AST¹⁾ and GGT²⁾ in serum of chick fed low-calcium diets containing various herbal sources for 3 weeks

Treatment	Total Bilirubin (mg/dℓ)	ALT (IU/ℓ)	AST (IU/ℓ)	GGT ³⁾ (IU/ℓ)
Control	0.2±0.0 ^a	1.1±0.9 ^a	147.0±22.5 ^a	22.3±2.9 ^a
Safflower	0.2±0.2 ^a	0.6±0.7 ^b	150.3±20.0 ^{ab}	23.7±4.9 ^{ab}

¹⁾ AST(aspartic aminotransferase, GOT), ALT(alanine aminotransferase, GPT)

²⁾ GGT(gamma glutamyl transferase)

간 기능과 관련된 생화학 지표로 측정된 Total Bilirubin, ALT, AST, GGT에서 Total Bilirubin은 대조구와 홍화처리구가 0.2 mg/dℓ로 차이가 없었다. ALT활성은 대조구의 1.1 IU/ℓ와 비교하여 홍화 처리구에서 0.6 IU/ℓ로 낮게 나타났다. AST활성은 대조구의 147 IU/ℓ와 비교하여 홍화 처리구에서 150 IU/ℓ로 다소 높았으나 유의차 범위 내에 있었다. GGT는 대조구와 홍화처리구에서 22.3 IU/ℓ ~ 23.7IU/ℓ로 유사하였다. 간기능 지표 분석결과 홍화는 간에 독성이 없는 것으로 판단하였다.

1.4.3. 혈청에 의한 ALP, 신장기능 지표 및 혈당 분석

시료 급여시 골분화 관련 효소 및 신장기능과 혈당의 변화를 측정하여 Table 15에 나타내었다.

Table 15. Values of Alkaline phosphatase, CRE¹⁾, Urea and Glucose in serum of chick fed low-calcium diets containing various herbal sources for 3 weeks

Treatment	ALP (IU/ℓ)	CRE (mg/dℓ)	Urea (mg/dℓ)	Glucose (mg/dℓ)
Control	8,314.4±41.5 ^a	0.3±0.1 ^a	4.5±2.0 ^a	225.3±25.4 ^a
Safflower	8,441.1±48.5 ^b	0.3±0.1 ^a	3.8±0.7 ^{ab}	229.3±18.8 ^{ab}

¹⁾ CRE (creatinine)

혈액내 총 ALP(alkaline phosphatase)양은 골화(mineralization)

과 관련된 효소로서 일반적으로 골형성시 증가하고 골형성이 진행된 경우 재흡수를 위하여 감소한다. Carusi 등(2001)은 난소를 제거한 쥐에게 genistin을 섭취시켰을 때, ALP의 활성이 높아져 골에 anabolic한 효과가 있다고 보고하였으며 Yamaguchi 등(1997, 1998)은 genistin이 부갑상선 호르몬에 의하여 감소되었던 ALP 활성을 정상수준을 회복시켰다고 하였다.

혈액내 ALP 활성은 홍화처리구 8,441 IU/ℓ로서 대조구 8,314 IU/ℓ 보다 다소 높은 결과를 나타내었다. ALP 활성이 높은 경우는 골화가 진행하고 있는 것으로, 낮은 경우는 골화 속도가 높아 재흡수가 시작되는 것으로 판단하였다. 이러한 현상은 시료의 활성기작과 속도가 다른데 기인한 것으로 추론하였으며 선발시료에 대하여 세포배양에 따른 ALP의 변화로부터 보다 명확해질 것으로 판단하였다.

신장기능과 관련하여 creatinine와 urea는 대조구와 비교하여 비슷하거나 낮게 나타났으며, 혈당의 경우도 대조구와 비교하였을 때 유의차 범위내에 있어 홍화 추출물은 혈당 및 신장기능에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 이는 추출물 3% 농도는 식이에 첨가했을 때 독성을 나타내지 않으며 안전성이 있는 것으로 판단할 수 있었다.

1.4.4. 혈청내 Ca와 P의 함량

시료 급여시 혈장내 총 Ca와 P의 함량은 Table 16과 같다.

Table 16. Values of total Ca and inorganic phosphate in serum of chick fed low-calcium diets containing Safflower for 3 weeks¹⁾

Treatment	Total Ca (mg/dℓ)	Inorganic P (mg/dℓ)
Control	6.4±0.6 ^a	7.9± 0.7 ^a
Safflower	7.5±0.7 ^{ab}	5.4± 0.4 ^b

¹⁾ All values are expressed as mean of 10 chicks, expressed as mean ± SD

골(骨)은 35%의 유기질, 45%의 무기질, 20%의 수분으로 이루어져 있으며 체내 무기질중 전체 칼슘의 99%를 함유하고 있다. 혈중 칼슘

의 농도의 변화는 골에 존재하는 칼슘의 영향을 받는다. 즉 골교환율의 증가는 골질의 감소를 초래하여 혈중 칼슘의 상승을 가져오므로 골흡수와 관련이 있다. 혈청내 총 칼슘 함량은 대조구에 비해 홍화군이 다소 높게 나타났으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

P(phosphorus)는 전체의 90%가 골에 존재하는 골의 무기질 구성 성분중의 하나로서 골흡수시 혈청중 인의 농도는 상승하므로 골대사와 관련이 있다. 대조구에 비해 홍화군의 인 함량이 낮아 홍화 식이의 공급으로 골흡수가 억제되는 것으로 사료된다.

본 실험에서 혈중 Ca 함량은 대조구 6.4 mg/dl와 비교하여 홍화 처리구에서 7.5 mg/dl로 높았으나 P의 함량은 대조구 7.9 mg/dl에 비하여 5.4 mg/dl로 낮아 체내 흡수가 다소 이루어진 것으로 보였다.

2. 난소적출 실험쥐에서 홍화의 골강화 효과

2.1. 체중의 변화

암컷쥐에서 난소를 적출(ovariectomy)하여 인위적으로 골다공증을 초래하면 폐경이 지난 여성의 모델이 될 수 있다.

난소적출한 쥐의 경우, estrogen의 부족에서 골밀도나 골파괴강도에 영향을 줄 것으로 판단되므로 시료가 골합성에 미치는 활성을 시험할 수 있다. 인위적으로 난소적출한 실험쥐에 홍화 추출물을 3%(건물량 기준) 첨가하여 골격성장에 미치는 영향을 조사하고 수평아리를 이용한 시험계와 교차 검증하고자 하였다. 체중의 변화는 골의 변화와 직접적인 관계성을 갖는 것은 아니나 일반적 사양효과를 점검할 수 있으며 골의 밀도 증가시 균일한 조건에서 체중의 변화가 있을 수 있다. 사양 후 체중의 변화를 Table 17에 나타내었다.

Table 17. Values of body weight, weigh difference and diet efficiency of ovariectomized rats with safflower for 6 weeks¹⁾ (Unit : g/rat)

Treatment	Initial body weight	After 6 weeks	Weigh difference	Diet efficiency
Sham	201.69±15.47 ^a	262.75±15.44 ^a	61.06±6.98 ^a	0.10±0.01
Control	204.58±19.87 ^{ab}	265.67±29.35 ^b	61.08±3.11 ^a	0.09±0.03
Safflower	207.55±13.26 ^b	267.84±26.75 ^{bc}	60.29±4.11 ^b	0.08±0.03

¹⁾ All values are expressed as mean of 8 rats, expressed as mean ± SD

Means with different superscript in the same column are different (p<0.05)

난소 절제한 쥐의 실험사료 급여 사양시험 결과 홍화군이 sham군과 control군에 비해 난소절제 후 체중증가 속도가 감소하여 활동성이 높은 것으로 고려하였다.

2.2. 장기무게

시험군의 장기 무게 변화는 Table 18과 같다.

Table 18. Organ weight of ovariectomized rats fed the experimental diet for 6 weeks¹⁾ (Unit : g/100g)

Treatment	Liver(g/100g bw)	Kidney(g/100g bw)
Sham	2.52±0.09 ^a	0.59±0.02 ^{ab}
Control	2.59±0.21 ^a	0.61±0.02 ^b
Safflower	2.54±0.14 ^a	0.56±0.04 ^a

¹⁾ All values are expressed as mean of 8 rats, expressed as mean ± SD

Means with different superscript in the same column are different (p<0.05)

간과 무게는 대조구의 2.6g과 비교하여 홍화군은 2.5g으로 대조구보다 다소 낮고, Sham군과 유사한 값을 나타내었고, 신장의 무게는 대조구의 0.6g

과 비교하여 홍화군이 0.56g으로 낮게 나타나 종합적으로 간과 신장에 대한 시료의 독성은 없는 것으로 판단하였다. 이는 간대사 관련 효소인 ALT와 AST 활성 등 혈액의 지표인자를 분석하여 보다 세부적으로 판단하였다.

2.3. 경골의 성장상태 측정

2.3.1. 경골의 길이, 두께 및 무게

난소절제한 쥐의 6주간 사양 후 경골의 길이, 무게, 중앙부위의 두께를 측정한 결과는 Table 19와 같다.

Table 19. Tibial length, thickness, wet weight of ovariectomized rats fed diets containing safflower extracts for 6 weeks¹⁾

Treatment	Total length(mm)	Thickness(mm)	Weight(g)	Weight(g) /Length(mm)
Sham	35.21±0.49 ^a	2.87±0.16 ^a	0.81±0.04 ^a	0.23±0.01 ^b
Control	35.15±0.94 ^a	2.83±0.16 ^a	0.76±0.07 ^a	0.22±0.02 ^{ab}
Safflower	35.58±1.04 ^a	2.84±0.17 ^a	0.76±0.06 ^a	0.21±0.01 ^a

¹⁾All values are expressed as mean of 8 rats, expressed as mean ± SD
Means with different superscript in the same column are different (p<0.05)

경골 중앙부위의 두께는 대조구의 2.83mm와 비교하여 홍화 처리구에서 2.84mm로 나타났고, 길이에 대한 무게의 비율은 대조구의 0.22g과 비교하여 모든 처리구에서 0.21g으로 다소 낮아 수평아리 실험에서 대조구에 비해 홍화 처리구가 다소 높게 나온 결과와 일치하지 않았다. 이는 수평아리와 쥐의 성장속도 및 칼슘조절과 호르몬 차단의 차이에서 기인한 것으로 판단하였다. 홍화 시료의 처리에 의하여 경골의 길이나 두께 등의 성장성에는 커다란 영향이 없었다. Estrogenic compound가 존재할 경우 골형성은 촉진하나 성장방해 효과도 동시에 있는 것으로 알려져 있어 골형성과 동시에 길이, 두께에서는 다소 억제되었을 수 있다. 이는 세포분화 측면에서 교차검증이 필요한 것으로 판단하였다.

2.3.2. 경골의 Displacement, breaking strength 및 stiffness

난소절제 쥐의 6주 사양후 경골의 breaking strength 및 stiffness를 측정한 결과는 Table 20과 같다.

Table 20. Displacement, breaking strength and stiffness of ovariectomized rats fed diets containing safflower extracts for 6 weeks¹⁾

Treatment	Displacement(mm)	Breaking strength(N)	Stiffness(N/mm)
Sham	0.56±0.05 ^a	104.78±3.56 ^a	186.30±13.97
Control	0.53±0.05 ^{ab}	106.60±9.95 ^{ab}	202.12±22.26
Safflower	0.57±0.05 ^b	110.57±7.91 ^b	193.72±14.95

¹⁾ All values are expressed as mean of 8 rats, expressed as mean ± SD
Means with different superscript in the same column are different (p<0.05)

경골의 displacement는 대조구의 0.53mm와 비교하여 홍화 처리구에서 0.57mm로 다소 높았으며, 뼈의 파괴 강도(breaking strength)는 대조구의 107N과 비교하여 홍화 처리구에서 111N으로 높아 골의 organic matrix 발달에 영향을 미친 것으로 판단하였다. 압력에 대한 측정기의 이동 거리면이나 힘에서 골의 강도가 증가한 것으로 나타났으나 상대적 비율인 Stiffness는 대조구 202.1N/mm와 비교하여 홍화 처리구에서 193.7N/mm로 다소 낮은 것으로 나타나 수평아리 실험과 일치하지는 않았다.

2.4. 난소절제 흰쥐의 혈액 지표인자 분석

2.4.1. 혈청 내 총콜레스테롤 및 총지질량

시료에 의한 혈청내 총콜레스테롤 및 총지질 변화는 Table 21과 같다.

Table 21. Values of total cholesterol and triglyceride in serum of ovariectomized rats fed the experimental diet for 6 weeks¹⁾

Treatment	Total Cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Sham	74.14±1.45 ^a	104.8±5.4 ^a
Control	80.21±1.97 ^{ab}	118.7±4.0 ^{ab}
Safflower	87.07±7.21 ^b	95.3±6.8 ^b

¹⁾ All values are expressed as mean of 8 rats, expressed as mean ± SD
Means with different superscript in the same column are different (p<0.05)

Cholesterol 함량은 대조구의 80.2mg/dl와 비교하여 홍화군에서 87.07mg/dl로 유의하게 높았다. 이는 난소 절제에 따른 호르몬의 변화에 기인한 것으로 고려하였다.

Triglyceride(TG) 함량은 대조구의 118.7mg/dl와 비교하여 홍화군에서 95.3mg/dl로 낮게 나타나 cholesterol 함량과 비례하지 않았다. 이는 동물성 기질과 달리 식물성 기질의 급여에서 기인한 것으로 판단하였다.

2.4.2. 혈청내 ALT 및 AST 활성

시료에 의한 ALT와 AST 활성결과는 Table 22와 같다.

Table 22. Values of total ALT¹⁾ and AST¹⁾ in serum of ovariectomized rats fed the experimental diet for 6 weeks²⁾

Treatment	ALT (IU/ℓ)	AST (IU/ℓ)
Sham	53.71±4.29 ^a	164.57± 9.16 ^{ab}
Control	44.57±2.80 ^{ab}	172.00± 9.10 ^b
Safflower	42.86±5.30 ^b	137.86±11.28 ^a

¹⁾ ALT(alanine aminotransferase, GPT), AST(aspartic aminotransferase, GOT)

²⁾ All values are expressed as mean of 8 rats, expressed as mean ± SD

Means with different superscript in the same column are different(p<0.05)

ALT와 AST는 간장과 심장에 다량 분포하며, 간세포가 손상되면 혈청중 농도가 상승하므로 간계질환의 지표가 된다. ALT(또는 GOT)는 심근경색이나 근육질환의 경우에도 증가하나 AST(또는 GPT)는 간세포 손상시 특이하게 상승하므로 간세포 손상에 의한 상관성이 ALT보다 높다.

ALT활성은 대조구 및 Sham군의 44.6 IU/ℓ ~53.7 IU/ℓ 과 비교하여 홍화 처리구에서 낮게 나타났다.

AST활성은 대조구 및 Sham군의 172 IU/ℓ ~165 IU/ℓ 과 비교하여 홍화 처리구에서 138 IU/ℓ 로 낮게 나타나 홍화는 간에 독성이 없음과 함께 기능 개선에도 영향이 있을 것으로 기대하였다.

2.4.3. 혈청내 ALP(Alkaline phosphatase 활성), Ca와 P의 함량

시료 급여시 혈청내 골분화 관련 효소, Ca과 P의 함량변화는 Table 23에 나타내었다.

Table 23. Value of total ALP, Ca and P in serum of ovariectomized rats fed the experimental diet for 6 weeks¹⁾

Treatment	ALP (IU/ℓ)	Total Ca (mg/dℓ)	Inorganic P (mg/dℓ)
Sham	108.29±24.64 ^a	11.20±0.15 ^a	6.53±0.28 ^a
Control	79.14±9.33 ^b	10.89±0.12 ^{ab}	6.84±0.22 ^a
Safflower	104.57±19.10 ^a	11.20±0.18 ^a	7.16±0.16 ^{ab}

¹⁾ All values are expressed as mean of 8 rats, expressed as mean ± SD
Means with different superscript in the same column are different (p<0.05)

ALP 활성은 대조구의 79.2 IU/ℓ 와 비교하여 Sham군과 홍화 처리구에서 104.6 IU/ℓ ~108.3 IU/ℓ 으로 높아 뼈 무기질 침착을 향진시키는 것으로 고려되었다.

혈액내 골화 효소인 ALP는 골아세포에 존재하여 극소의 뼈 무기질 침착을 향진시키고, 소아기와 골형성이 활발하게 진행될 때 혈중내에서 의미있게 증가한다. 그러나 간·담도계 질환 및 골생성이 동반되는 골질환 및 난소적출후에도 ALP활성이 증가한다. 또한 개복만 시행한 Sham군에서도 ALP 활성이 높았다.

혈청내 총 Ca 함량은 대조구 10.9 mg/dℓ와 비교한 경우 홍화 처리구에서 11.2 mg/dℓ로 다소 높았다. 혈액과 골의 칼슘 교환과 흡수 관계가 다소 생성된 것으로 판단할 수 있었다.

혈청내 P(phosphorus)는 대조구의 6.84 mg/dℓ과 비교하여 홍화 처리구에서 7.16mg/dℓ으로 다소 높아 이는 인의 함량이 낮아 골흡수는 억제되는 것으로 고려한 수평아리의 결과와는 일치하지 않았다.

2.4.4. 발골시료의 무기질 함량분석

대퇴골 및 경골 발골시료의 무기질 함량분석은 Table 24와 같다.

Table 24. Bone mineral contents of femur and tibia of ovariectomized rats fed the experimental diet for 6 weeks¹⁾

Treatment	Unit : mg/100g					
	Ca		P		Mg	
	Femur	Tibia	Femur	Tibia	Femur	Tibia
Sham	23551.6	23839.1	11294.7	11634.0	397.0	439.4
Control	18389.2	20197.8	10922.6	10616.4	370.7	384.8
Safflower	24752.9	21792.4	11070.0	11325.7	396.3	411.6

¹⁾ All values are expressed as mean of 8 rats

대퇴골 발골시료의 경우 Ca는 Sham군 23551.6 mg/100g, Control군 18389.2 mg/100g, 홍화시료군 24752.9 mg/100g로 측정되었으며 P는 Sham군 11294.7 mg/100g, Control군 10922.6 mg/100g, 홍화시료군 11070.0 mg/100g로 측정되었고 Mg는 Sham군 397.0 mg/100g, Control군 370.7 mg/100g, 홍화시료군 396.3 mg/100g로 측정되었다. 경골 발골시료의 경우 Ca는 Sham군 23839.1 mg/100g, Control군 20197.8 mg/100g, 홍화시료군 21792.4 mg/100g로 측정되었으며 P는 Sham군 11634.0 mg/100g, Control군 10616.4 mg/100g, 홍화시료군 11325.7 mg/100g로 측정되었고 Mg는 Sham군 439.4 mg/100g, Control군 384.8 mg/100g, 홍화시료군 411.6 mg/100g로 측정되었다. 대퇴골, 경골 모두에서 무기질 침착은 난소를 절제하지 않은 위대조군 (sham군)이 가장 높았으며, 난소 절제군에서는 홍화처리군이 Control군보다 높은값을 나타내어 홍화의 골기질 무기질 형성효과를 확인할수 있었다.

제 6 절 골강화 성분의 이화학적 특성

1. 농도활성 관계 (dose-response)

홍화 추출물의 농도에 따른 활성에 대하여 인간유래 세포주인 Saos-2를 대상으로 증식능(Fig. 20)과 효소활성능(Fig. 21)을 측정하였다.

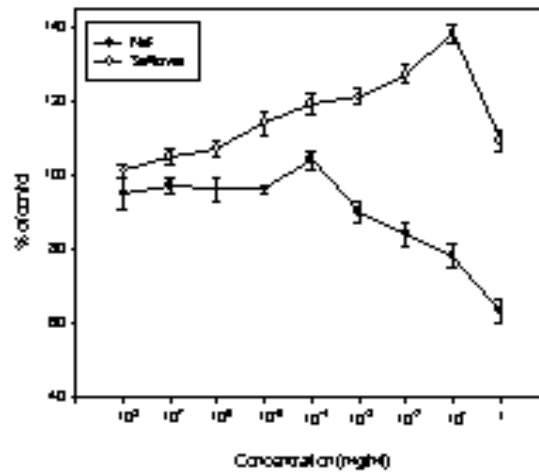


Fig. 20. Does-response of Safflower extracts on the cell proliferation of Saos-2, human-like osteoblast cells.

홍화 추출물은 모든 농도에서 대조구와 비교하여 100% 이상의 증식 활성을 내었다. 세포 증식능은 10⁻⁸mg/ml에서 101%를 시작으로 차차 증가하여 10⁻¹mg/ml에서 138%로 가장 높은 증식활성을 보였고 1mg/ml에서 109%로 감소하였다. 양성대조구로서 사용된 화합물 NaF는 10⁻⁸mg/ml에서 증식도 95%를 보였고 농도 증가에 따라 10⁻⁴mg/ml에서 104%를 나타내었으나 그 이상의 농도에서는 감소하여 1mg/ml에서 63%의 낮은 증식도를 보였다. 홍화추출물은 NaF와 비교하여 증식능이 우수하였고 독성이 없는 것으로 조사되었다.

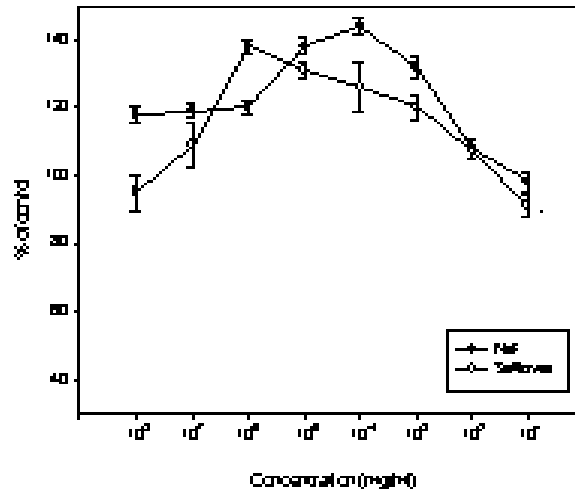


Fig. 21. Dose-response of Safflower extracts on the Alkaline phosphatase activities of Saos-2, human-like osteoblast cells.

조골세포 활성도의 지표인자인 ALP(alkaline phosphatase activity) 활성은 홍화추출물의 경우 10^{-7} mg/ml에서 100% 이상을 나타내었으며 차차 증가하여 10^{-6} mg/ml에서 138%로 최고 활성을 보였다. NaF는 10^{-4} mg/ml에서 144%의 활성을 나타내었으며 전체적으로 98%~144%를 보였다. 홍화 추출물은 10^{-6} mg/ml에서 양성대조구에 접근할 정도로 우수한 조골세포 활성을 나타내었다.

2. 온도에 따른 골세포 활성화 변화

홍화 추출물의 가열온도와 가열시간에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 조사하였다.

2.1. 가열온도의 영향

홍화추출물의 가열온도에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 Fig. 22 및 Fig. 23에 나타내었다.

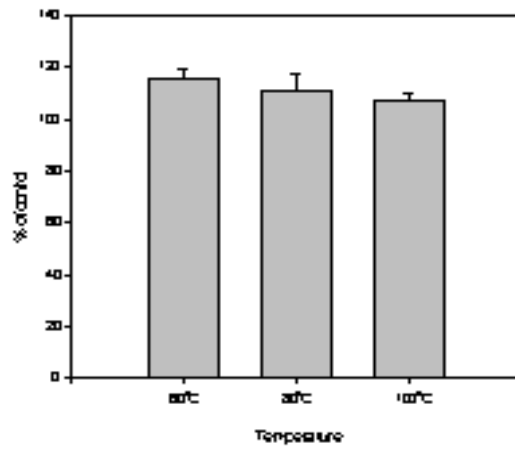


Fig. 22. Cell proliferation effects of Safflower extracts on various temperatures.

온도에 따른 조골세포 증식능은 온도를 60°C ~ 100°C로 증가시킨 경우 116%에서 107%로 감소하였으나 온도처리를 하여도 100% 이상의 증식능을 유지하였다.

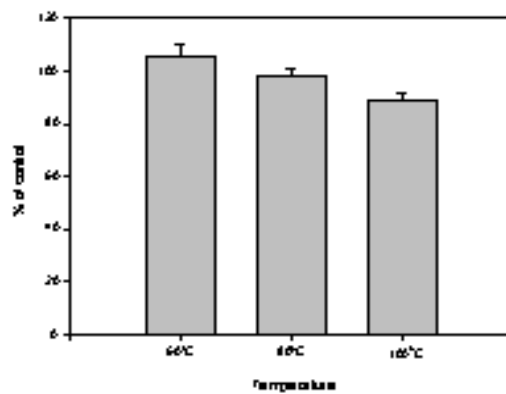


Fig. 23. Alkaline phosphatase activities of Safflower extracts on various temperatures.

온도처리에 따라 효소 활성은 60°C에서 약 25% 감소하여 105%를 나타내었으며 온도가 증가함에 따라 89%까지 감소하였다.

2.2. 가열시간의 영향

홍화추출물의 가열시간에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 Fig. 24 및 Fig. 25에 나타내었다.

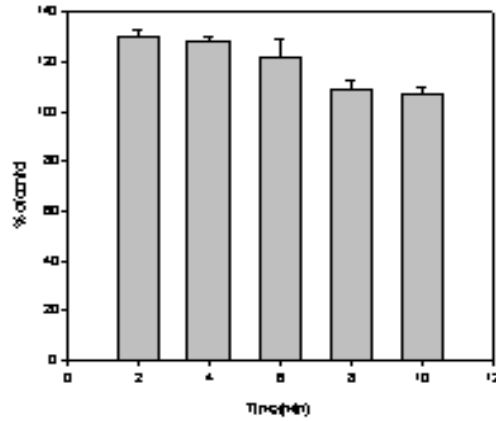


Fig. 24. Cell proliferation effects of Safflower extracts on various heating time.

가열시간에 따른 증식능은 가열초기에 4분까지 128%~130%로 높았으나 가열 6분부터 감소하여 가열 10분에는 107%로 감소하였다. 온도처리를 시간별로 한 경우도 100% 이상의 증식능을 유지하였다.

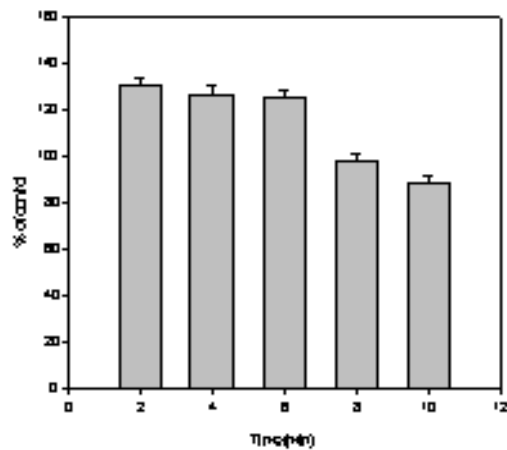


Fig. 25. Alkaline phosphatase activities of Safflower extracts on various heating time.

가열시간에 따른 효소활성도는 가열시작에서 6분까지 126%~131%로 높았으나 가열 8분부터 급격히 감소하여 가열 8분에는 98%로 감소하였다. 가열시간이 10분을 초과하는 경우 89%이하로 낮아졌다.

온도에 따른 골세포의 영향은 증식능의 경우 온도변화에도 100% 이상의 양호한 증식능을 보였다. 효소활성도는 10분간 가열한 경우 비교적 낮은 온도에서도 활성도가 낮아졌으나 가열시간을 8분 이내로 한 경우 높은 온도에서도 효소활성도가 유지되므로 온도보다는 가열시간에 영향을 받았다. 따라서 홍화의 골세포 활성제품 가공시 단시간 고온살균이 요구되었다.

3. pH에 따른 골세포 활성화 변화

홍화 추출물의 pH 변화에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 Fig. 26, Fig. 27에 나타내었다.

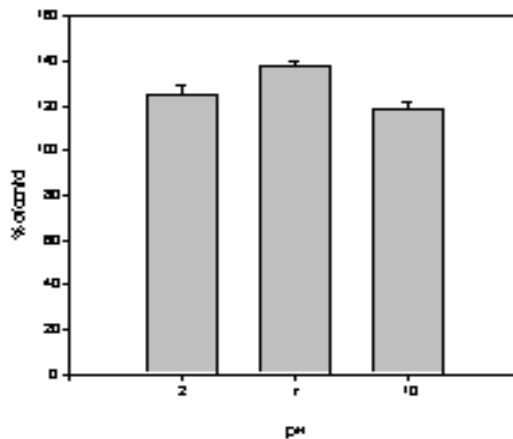


Fig. 26. Cell proliferation effects of Safflower extracts on various pH.

pH에 따른 조골세포 증식능은 pH 7에서 138%로 높았으며 pH 2와 10에서는 각각 135%, 118%를 나타내었다. pH의 변화에서 골세포 증식능은 높은값을 유지하였다.

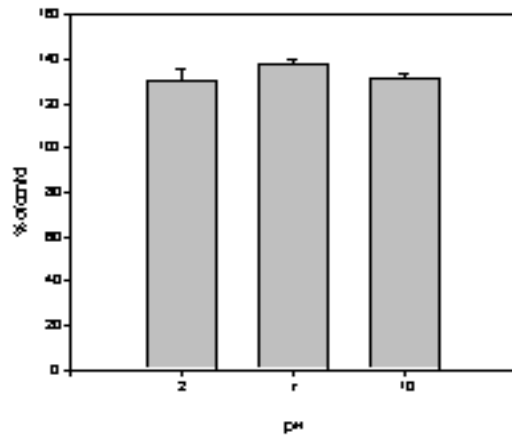


Fig. 27. Alkaline phosphatase activities of Safflower extracts on various pH.

pH에 따른 효소 활성도는 pH 7에서 138%로 높았으며 pH 2, pH 10에서 130%를 나타내었다. 홍화추출물은 pH의 변화에서 높은 효소활성도를 유지하여 pH 변화에 영향이 크지 않았다. pH의 변화에 따라 증식능과 효소활성이 우수하여 체내활성의 가능성을 간접 확인하였다.

4. 세포내 작용특성

홍화 추출물의 조골 및 파골 억제 특성을 종합한 결과는 Fig. 28과 같다.

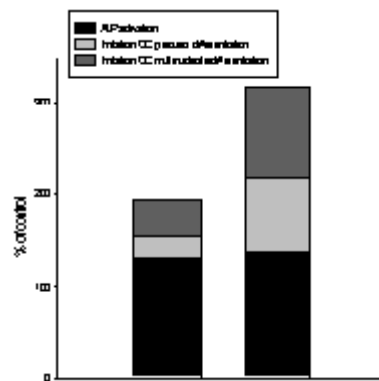


Fig. 28. Osteo-activity characteristics of on the osteoblast and osteoclast cell.

홍화추출물은 조골 및 파골 특성을 모두 나타내었다. 파골의 경우 Osteoblast 및 stromal cell 세포막의 RANKL-OPG 반응으로부터 precursors cell 형성 및 multinucleate cell의 분화과정을 모두 억제하였으며 multinucleate cell의 분화억제 효과가 보다 높았다.

제 7 절 활성성분의 분리 및 물질 특성

1. 시료의 용매분리 및 성분특성

1.1. 분획물의 수율

추출물의 분획 후 수율은 다음 Table 25와 같다.

Table 25. Yield of solvent partition layer of sample extracts Unit : %

Treatment	<i>n</i> -hexane	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O
Safflower	715.2mg	250mg	170mg	844.8mg
	36.1%	12.6%	8.6%	42.7%

추출물 기준으로 분획 후 수율은 Hexane층 36.1%, EtOAc층 12.6%, BuOH층 8.6%, 수용액층 42.7%로 나타났다.

1.2. TLC를 이용한 주요물질 검정

각 분획물을 대상으로 분배가 양호한 용매비율을 선정하여 물질을 전개하고 형광반응 물질 등까지 검색한 다음 발색시약과 표준물질을 비교하였다. 물질의 분포도는 Fig. 29와 같다.

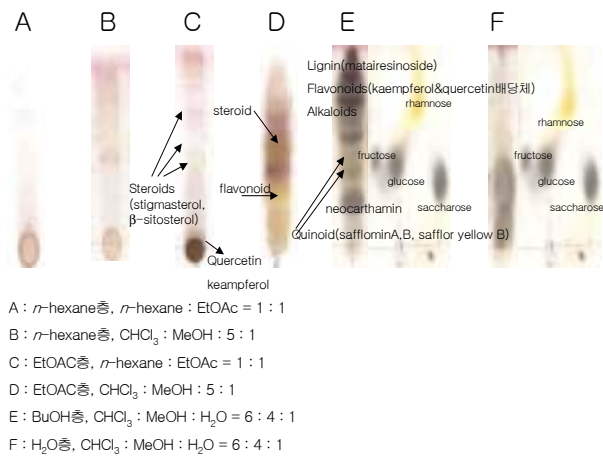


Fig. 29. TLC profile of solvent fractions of safflower extracts

표준물질 전이수율은 Butanol (BuOH) 분획에서 높았으며 Hexane 분획의 TLC에서는 뚜렷한 spot 이 보이지 않았다. Ethylacetate (EtOAc) 분획에서는 sterol과 flavonoid (Quercetin, kaempferol) 화합물들이 주요 성분을 이루고 있었다. *n*-BuOH 분획에는 lignan 배당체, 플라보노이드 배당체가 주요 성분이 것으로 판명되었다. 수용 액층에서는 포도당 등 당류가 존재하고 있는 것으로 조사되었다. EtOAc 분획과 BuOH 분획에서 ferric chloride에 양성반응을 보인 spot 이 다수 확인되었다. 각 분획에 함유되어 있는 화합물은 검색과 분획을 반복하여 활성성분을 보다 세분화할 것이다. 골강화 시험법으로 세분화할 경우 분리조건과 활성화합물은 홍화의 제품응용을 위한 대량 추출방식의 기초가 될 것이다.

2. 골강화 활성성분의 분리

2.1. 홍화의 골강화 활성성분의 용매분획

홍화의 핵심 활성성분을 파악하기 위하여 성분확인 첫 단계로 용매 분획하였다. 홍화의 에탄올 추출물을 butanol (BuOH)와 ethylacetate (EtOAc)로 극성에 따라 분획하였다. 분획물별로 골세포 증식과 효소활성도를 측정하

여 성분의 세포독성 및 골강화 활성을 검색하였다(Fig. 30, Fig 31).

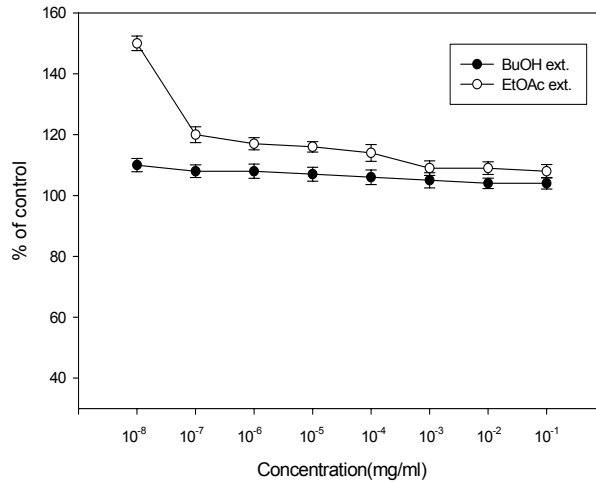


Fig. 30. Cell proliferation effects of solvent partition of safflower extracts.

EtoAc 획분은 10^{-8} mg/ml에서 150%로 가장 높은 증식 활성을 나타내었으며 농도 증가에 따라 증식 활성은 점차 감소하였다. EtoAc의 증식 활성은 10^{-7} mg/ml~ 10^{-4} mg/ml에서 114%~120%의 증식활성을 보였고 10^{-3} mg/ml~ 10^{-1} mg/ml에서 108%의 증식활성을 나타내었다. BuOH 획분도 농도 증가에 따라 활성이 감소하여 EtoAc 획분과 유사한 경향이었으며 10^{-8} mg/ml~ 10^{-1} mg/ml 등 전체 농도에서 104%~110%의 증식활성을 나타내었다. 두 획분 모두 100% 이상의 증식활성을 나타내었으나 EtoAc 획분의 증식활성이 우수하였다.

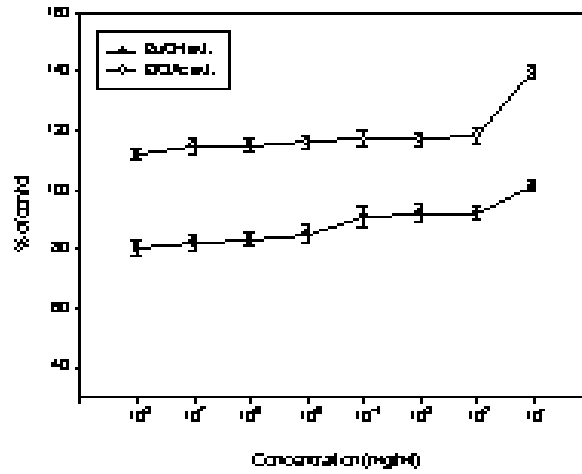


Fig. 31. Alkaline phosphatase activities of solvent partition of safflower extracts.

홍화 용매분획물의 골세포 효소 활성도는 EtoAc 획분의 경우 10^{-8} mg/ml에서 점차 증가하여 10^{-2} mg/ml 까지 112%~118%의 농도를 나타내었으며 10^{-1} mg/ml에서 140%로 최고 값을 보였다. BuOH 분획물도 농도 증가와 비례하여 효소활성도도 증가하였으나 10^{-8} mg/ml~ 10^{-2} mg/ml에서 89%~92%로 낮은 활성을 나타내었고 10^{-1} mg/ml에서 101%의 활성을 보였다. 홍화 추출물을 분획하였을 경우 효소활성도는 농도에 비례하였으며 EtoAc 분획물의 활성이 높았다.

2.2. 용매분획물의 column chromatography

2.2.1. Open column chromatography (1차)

용매분획결과 활성이 높았던 EtoAc 분획물에 대하여 1차 column chromatography하여 세분화 하였다.

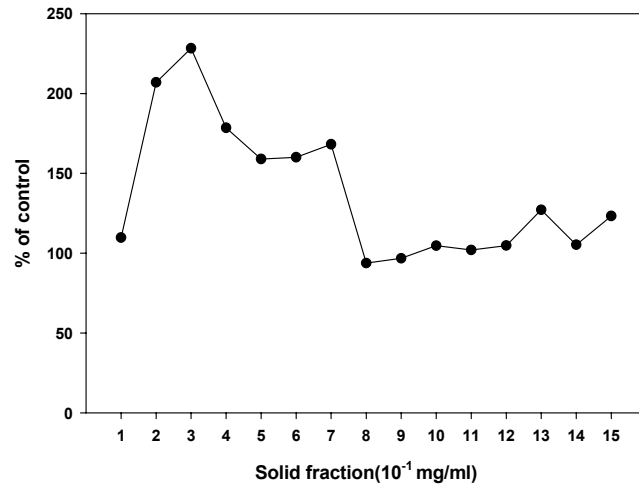


Fig. 32. Cell proliferation of 1st fractions from column chromatography of EtOAc partition of safflower extract on Saos-2, human-like osteoblast cells.

홍화 EtoAc ext. 분획물을 10^{-1} mg/ml로 MTT assay를 통해 인체유사 조골 세포주인 Saos2 cell에 대해 세포증식능을 측정한 결과, 2번과 3번 분획물이 대조구 보다 세포증식이 2배 이상 증가하여 각각의 세포증식율이 206.9%와 228.2%로 나타났다. 4번~7번 분획물도 대조구에 비해 높은 세포증식율을 보여 158.9~178.4%의 증식율을 나타내었고, 다른 solid fraction에서도 대조구 보다 비교적 높은 세포증식능을 나타내어 홍화 EtoAc ext. 1차 분획물의 조골세포 증식능이 비교적 우수한 것으로 고려되었다.

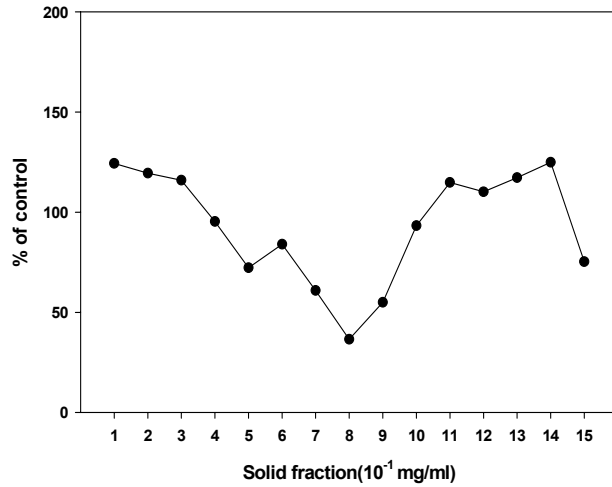


Fig. 33. Alkaline phosphatase (ALP) activities of 1st fractions from column chromatography of EtOAc partition of safflower extract on Saos-2, human-like osteoblast cells.

홍화 EtoAc ext, solid 분획물을 10⁻¹ mg/ml 농도로 Saos2 cell에 적용하여 Alkaline phosphatase(ALP) 활성을 측정한 결과 1~3번과 11~14번 분획물의 ALP 활성이 대조구에 비해 비교적 높은 것으로 측정되어 124.8%~110.2%로 나타났다. 4번과 10번 분획물을 대조구와 비슷한 ALP 활성을 나타내었고, 나머지 분획물은 대조구 보다 낮은 ALP 활성을 나타내었으며 8번 분획물이 가장 낮은 ALP 활성을 나타내어 36.5%로 측정되었다.

2.2.1. Open column chromatography (2차)

1차 chromatography 결과 증식능과 ALP 활성이 높은 fraction을 대상으로 2차 column chromatography하여 분리를 세분화 하였다.

2D Graph 1

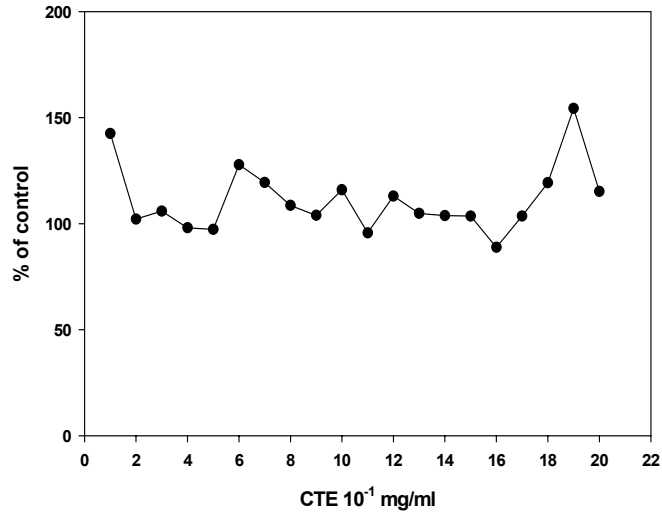


Fig. 34. Cell proliferation of 2nd fractions from column chromatography of EtOAc partition of safflower extract on Saos-2, human-like osteoblast cells.

홍화 1차 chromatography 분획물을 2차 분획하고 MTT assay를 통해 인체유사 조골 세포주인 Saos2 cell에 대해 세포증식능을 측정한 결과, 전체적으로 대조구의 100%이상 활성을 나타내어 세포독성이 없었다. Fraction 1번에서 증식능이 대조구의 148%로 높았으며 Fraction 6~10번, Fraction 12~15번은 105%~125%를 나타내었고 Fraction 19번은 153%로 가장 높은값을 보였다.

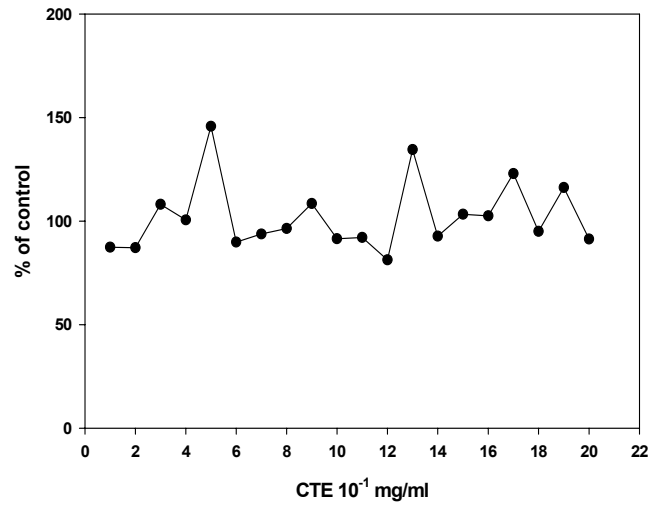


Fig. 35. Alkaline phosphatase (ALP) activities of 2nd fractions from column chromatography of EtOAc partition of safflower extract on Saos-2, human-like osteoblast cells.

홍화 1차 분획물을 2차분획하고 Alkaline phosphatase(ALP) 활성을 측정된 결과 Fraction5번에서 149%, Fraction 13번에서 138%로 높아 두 Fraction과 주변 Fraction의 물질특성을 TLC로 확인한후 유사 Fraction을 선별, 조합하였다. 분리한 Fraction은 2-D TLC를 시행하고 활성 spot을 정제한 다음 물질의 특성을 구명하였다.

2.3. 분리물의 정성분석

분리한 Fraction 가운데 활성이 높은 5~12번을 대상으로 골강화 활성성분의 정성분석을 시행하였다(Table 26).

Table 26. Qualitative analysis of fractions from column chromatography of EtOAc partition of safflower extract.

Reagent	Compounds	Coloring response
10% H ₂ SO ₄	Generals	+
Dragendorff's reagent	Flavonoids, Alkaloid	Strong orange
Ferric chloride	Phenolics	Weak blues
Ninhydrin	amino acids amines, aminosugars	-

Dragendorff's reagent spray 발색 결과 강한 오렌지 발색이 확인되어 활성성분은 Alkaloid, Flavonoid 계열의 성분임을 확인하였다. Ferric Chloride spray 발색 결과에서는 약한 청색이 발색되어 Phenolic 성분의 존재도 일부 확인되었다.

3. 홍화종자로부터 활성물질의 분리, 동정

홍화씨의 MeOH 추출물로부터 ALP activity-guided fractionation에 따라 lignan 1종과 alkaloid 1종의 화합물을 분리, 동정하였다.

3.1. 화합물 1의 구조

화합물 1의 스펙트럼 특성: ¹H-NMR(400 MHz, pyridine-*d*₅, **δ**) 7.59(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 7.15(1H, d, *J*=2 Hz, H-2'), 7.04(1H, dd, *J*=8.5, 2 Hz, H-6'), 6.91(1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5), 6.90(1H, d, *J*=1.7 Hz, H-2), 6.86(1H, dd, *J*=8.1, 1.7 Hz, H-6), 5.66(1H, d, *J*=7.2 Hz, H-1''), 4.30(1H, dd, *J*=9.2, 8.4 Hz, H-9a), 4.16(1H, dd, *J*=8.4, 7.6 Hz, H-9b), 3.79(3H, s), 3.74(3H, s), 3.73(3H, s), 3.63(1H, d, *J*=13.2 Hz, H-7'a), 3.31(1H, d, *J*=13.2 Hz, H-7'b), 2.73(1H, m, H-8) ¹³C-NMR(100 MHz, pyridine-*d*₅, **δ**) 178.67(C-9'), 149.37(C-3), 149.37(C-3'), 147.92(C-4), 146.50(C-4'),

131.84(C-1'), 129.71(C-1), 122.80(C-6'), 120.66(C-6), 115.44(C-5'),
114.59(C-2'), 112.73(C-2), 112.10(C-5), 101.74(C-1''), 78.34(C-5''),
78.00(C-3''), 76.13(C-8'), 74.29(C-2''), 70.61(C-4''), 70.42(C-9),
61.73(C-6''), 55.48(OCH₃), 55.39(OCH₃), 55.35(OCH₃), 43.61(C-8),
41.09(C-7'), 31.31(C-7).

화합물 1은 ¹H-NMR spectrum에서 δ 7.59(1H, d), δ 7.15(1H, d), δ 7.04(1H, dd), δ 6.91(1H, d), δ 6.90(1H, d) 및 δ 6.86(1H, dd)의 signal로부터 olefinic methine proton 6개를 관측할 수 있었고, chemical shift 값으로 보아 벤젠 고리에서 유래하였다는 것을 추정할 수 있었다. δ 4.30(1H, dd) 및 δ 4.16(1H, dd)의 signal로부터 한 개의 oxygenated methylene proton이 존재함을 알 수 있었으며, δ 3.79(3H, s), δ 3.74(3H, s) 및 δ 3.73(3H, s)에서 3개의 oxygenated methyl proton을 관측할 수 있었다. 또한 δ 4.361(1H, m)에서 1개의 methine proton을 확인하였고, δ 3.63(1H, d) 및 δ 3.31(1H, d), δ 3.24(1H, dd) 및 δ 2.94(1H, dd)에서 각각 1개씩의 methylene proton을 관측할 수 있었다. δ 5.66(1H, d)에서는 anomeric proton으로 보여 지는 signal과 δ 4.2 - δ 3.0사이에서 다수의 methine proton과 methylene proton이 관측되어 한 분자의 당이 존재함을 확인할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서 총 27개의 탄소가 관측되었으며, δ 178.67에서 한 개의 esteric carbon signal을 관측할 수 있었다. δ 149.37(\times 2), δ 147.92 및 δ 146.50에서 4개의 산소가 결합되어있는 olefinic quaternary carbon signal을 확인할 수 있었고, δ 131.84 및 δ 129.71에서 2개의 olefinic quaternary carbon signal을 관측할 수 있었으며, δ 122.80, δ 120.66, δ 115.44, δ 114.59, δ 112.73 및 δ 112.10에서 6개의 olefinic methine carbon signal을 확인하였다. 이와 같은 결과로 벤젠 고리 두개가 존재함을 알 수 있었다. δ 76.13에서는 oxygenated quaternary carbon signal이 확인되었고, δ 71.32에서는 1개의 oxygenated methylene carbon signal을 확인할 수 있었으며, δ 55.48, δ 55.39 및 δ 55.35에서 3개의 oxygenated methyl carbon signal이 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 δ 43.61, δ 41.09 및 δ 31.31에서는 각각 한 개의 methine carbon과 2개의 methylene carbon signal을 관측할 수 있었으며,

당 signal은 문헌비교 조사 결과 glucose로 판명되었다. 이 결과 화합물 **1**은 phenyl propanoid 두 분자가 결합한 lignan 화합물에 한 분자의 glucose와 3개의 methoxy group이 결합되어 있는 것으로 추정되었다. 좀 더 정확한 구조와 당 및 methoxy group의 위치를 결정하기 위해 2D-NMR을 측정하였다. ^1H - ^1H COSY 스펙트럼으로부터 일련의 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. HMBC 스펙트럼에서 δ 146.50(C-4')의 signal과 δ 5.66(1H, d)의 anomeric proton signal 사이에서 correlation이 확인되어 당이 C-4'에 결합되어 있다는 것을 알 수 있었고, δ 149.37($\times 2$, C-3, 3') 및 δ 147.92(C-4)의 signal이 각각 δ 3.79(3H, s), δ 3.74(3H, s) 및 δ 3.73(3H, s)의 signal과 correlation을 보임으로써 methoxy group은 C-3, 3' 및 4에 결합되어 있다는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 종합하여 화합물 **1**을 lignan 화합물의 일종인 tracheloside로 동정하였다.

3.2. 화합물 **2**의 구조

화합물 **2**의 스펙트럼 특성: ^1H -NMR(400 MHz, CD_3OD , δ) 7.41(1H, d, $J=16.2$ Hz, H-7'), 7.38(1H, s, H-4), 7.33(2H, d, $J=7.8$ Hz, H-2', 6'), 7.19(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-7), 7.01(1H, s, H-2), 6.93(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-6), 6.74(2H, d, $J=7.8$ Hz, H-3', 5'), 6.35(1H, d, $J=16.2$ Hz, H-8'), 4.87(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 3.52(2H, br s, H-9), 2.90(2H, br s, H-8) ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD , δ) 169.05(C-9'), 160.18(C-4'), 152.60(C-5), 141.61(C-7'), 134.25(C-7a), 130.44(C-2', 6'), 128.85(C-1'), 127.47(C-3a), 124.45(C-2), 118.32(C-8'), 116.56(C-3', 5'), 114.13(C-6), 113.11(C-3), 112.45(C-7), 106.59(C-4), 103.97(C-1''), 77.96(C-5''), 77.92(C-3''), 75.05(C-2''), 71.55(C-4''), 62.63(C-6''), 41.42(C-9), 26.39(C-8).

화합물 **2**는 ninhydrin 발색 결과 분홍색 spot이 확인되어 질소가 함유된 alkaloid 화합물이라는 것을 확인하였고, ^1H -NMR spectrum에서 δ 7.41(1H, d)의 signal과 이와 16.2 Hz로 coupling을 이루는 δ 6.35(1H, d)의 signal로부터 trans 결합을 하고 있는 2개의 olefinic methine proton을 확인 할 수 있었으

며, δ 7.38(1H, s), δ 7.33(2H, d), δ 7.19(1H, d), δ 6.93(1H, d) 및 δ 6.74(2H, d)에서 7개의 olefinic methine proton signal이 확인되어 벤젠 고리가 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 7.01(1H, s)에서 1개의 olefinic methine proton signal이 확인되어 벤젠고리 이외의 이중결합이 존재함을 확인할 수 있었다. δ 41.42(2H, br s) 및 δ 26.39(2H, br s)에서는 2개의 methylene proton signal이 관측되었으며, δ 4.87(1H, d)에서는 anomeric proton으로 보여 지는 signal과 δ 4.0 - δ 3.0 사이에서 다수의 methine proton과 methylene proton이 관측되어 한 분자의 당이 존재함을 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 총 25개의 탄소가 관측되었고, δ 152.60의 signal로부터 산소가 결합되어 있는 1개의 olefinic quaternary carbon을 확인할 수 있었으며, δ 134.25에서 질소와 결합한 것으로 보이는 olefinic quaternary carbon signal과 δ 127.47에서 olefinic quaternary carbon signal을 각각 1개씩 관측할 수 있었다. 또한 δ 124.45 및 δ 113.11에서 각각 1개씩의 olefinic methine과 olefinic quaternary carbon signal을 확인할 수 있었으며, δ 41.42에서 질소와 결합한 methylene carbon과 δ 26.37에서 methylene carbon signal을 관측할 수 있었다. 문헌 비교 검색 결과 화합물 2는 serotonin 한 분자를 가진 화합물이라는 것을 확인할 수 있었다. serotonin 구조 이외에 δ 169.05에서 1개의 ketone이 존재함을 확인할 수 있었고, δ 160.18에서 산소가 결합한 olefinic quaternary carbon과 δ 128.85에서 olefinic quaternary carbon signal이 관측되었으며, δ 130.44($\times 2$) 및 δ 116.56($\times 2$)에서 4개의 olefinic methine carbon signal을 확인하였다. 이와 같은 chemical shift 값을 보아 벤젠고리 1개가 존재함을 알 수 있었고, 벤젠고리 이외에 δ 141.61 및 δ 118.32의 signal로부터 한 쌍의 이중결합이 더 존재함을 알 수 있었다. 또한 당 signal은 문헌비교 조사 결과 glucose로 판명되었다. 이로써 화합물 2는 serotonin 한 분자에 coumaroyl group과 당이 결합한 화합물이라는 것을 추정할 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 coumaroyl group 및 당의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다. ^1H - ^1H COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. HMBC 스펙트럼에서 δ 169.05(C-9')의

signal과 δ 3.52(H-9)의 methylene proton signal 사이에서 correlation이 확인되어 coumaroyl group이 serotonin의 C-9에 존재하는 말단 질소에 결합되어 있다는 것을 알 수 있었고, δ 152.60(C-5)의 signal과 δ 4.87(1H, d)의 anomeric proton signal 사이에서 correlation이 확인되어 당이 C-5에 결합되어 있다는 것을 알 수 있었다. 이를 종합하여 화합물 2를 N-(*p*-coumaroyl)serotonin mono- β -D-glucopyranoside로 동정하였다.

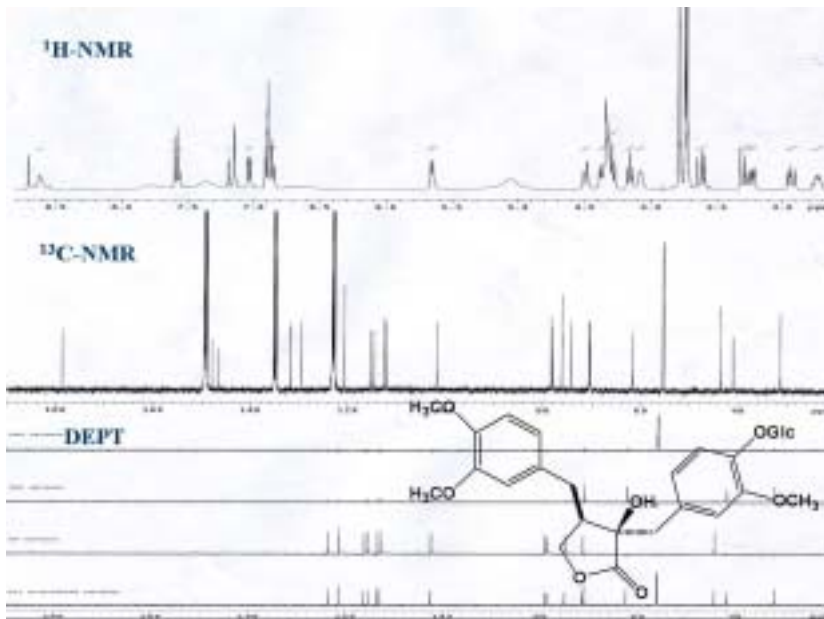


Fig. 36. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ & DEPT(100MHz) spectra of tracheloside from the seed of *Carthamus tictorius* L.

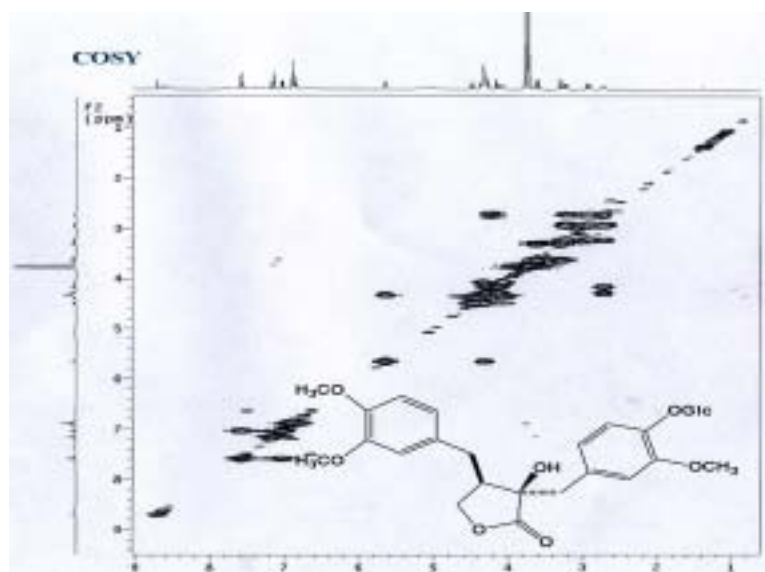
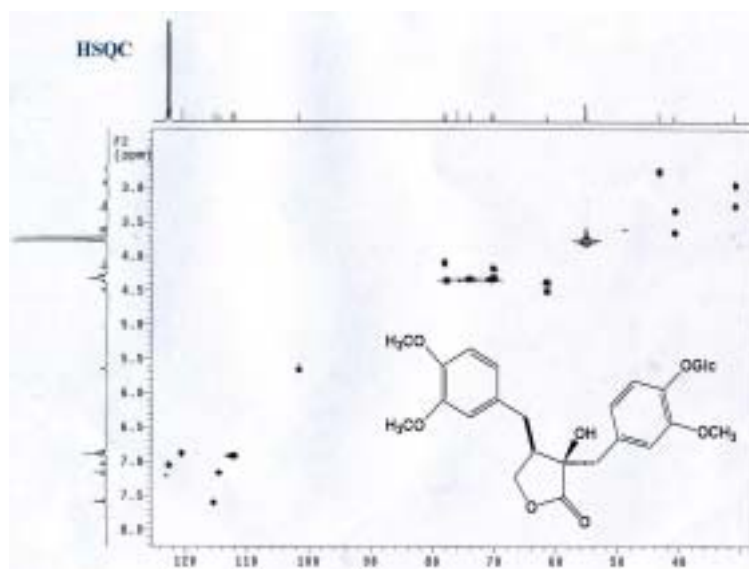


Fig. 37. COSY spectrum of tracheloside from the seed of *Carthamus tictorius* L.



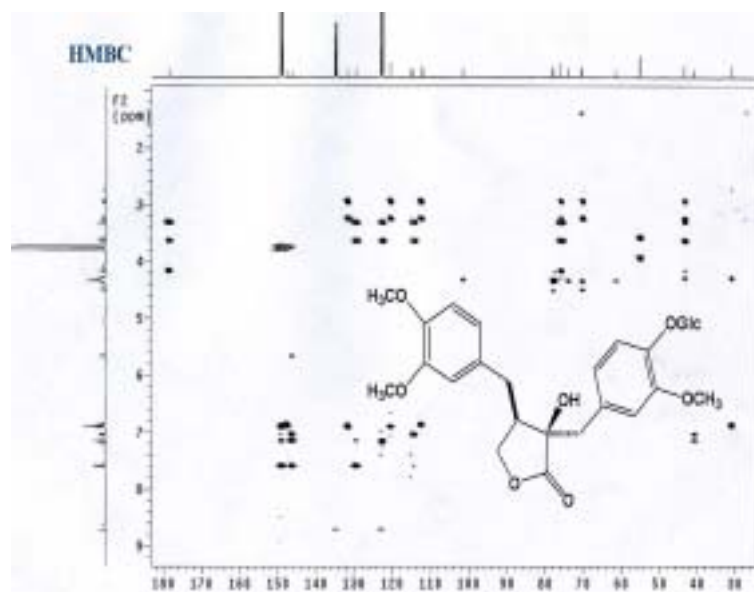


Fig. 38. HSQC & HMBC spectra of tracheloside from the seed of *Carthamus tictorius L.*

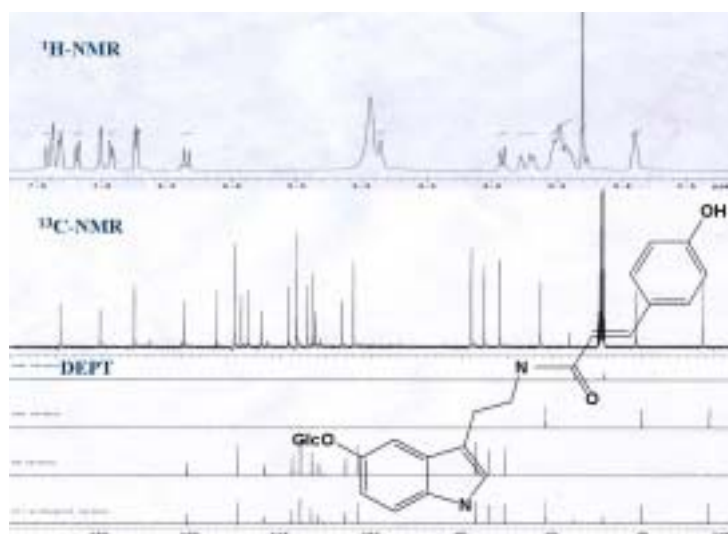


Fig. 39. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ & DEPT(100MHz) spectra of N-(*p*-coumaroyl)serotonin mono- β -D-glucopyranoside from the seed of *Carthamus tictorius L.*

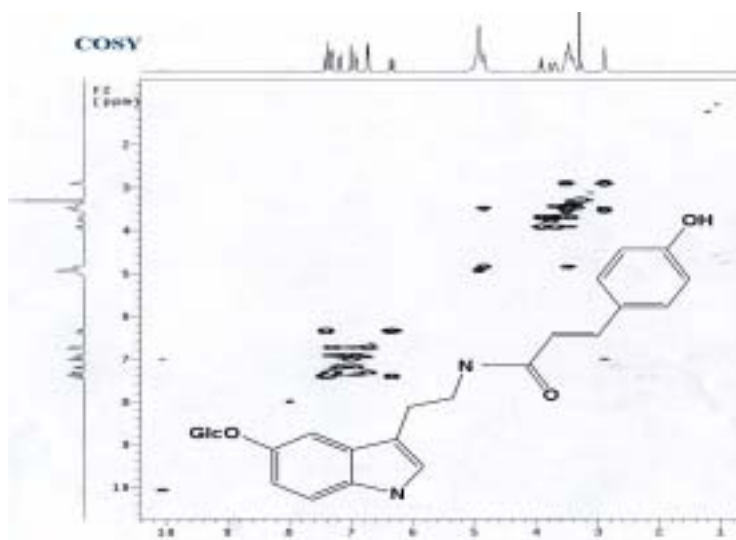
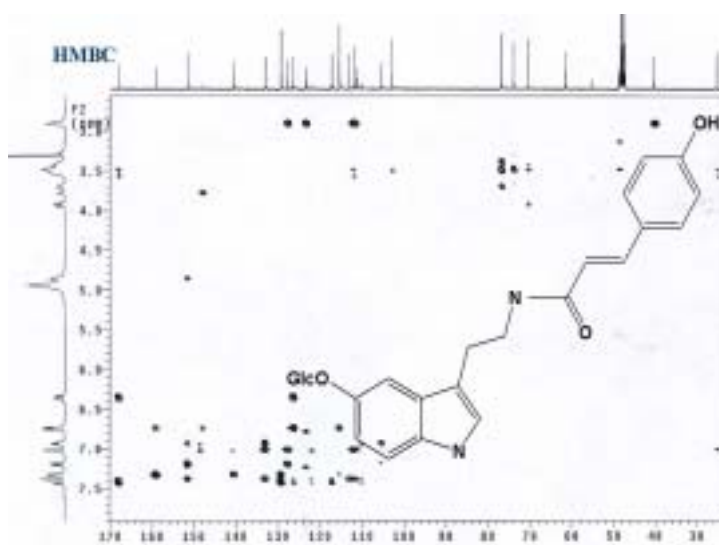


Fig. 40. COSY spectrum of N-(*p*-coumaroyl)serotonin mono- β -D-glucopyranoside from the seed of *Carthamus tictorius* L.



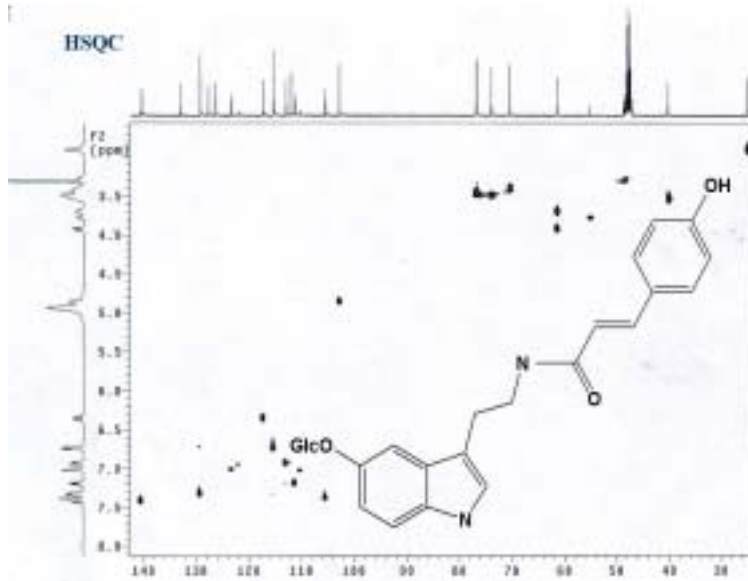


Fig. 41. HSQC & HMBC spectra of N-(*p*-coumaroyl)serotonin mono- β -D-glucopyranoside from the seed of *Carthamus tinctorius* L.

4. 활성성분의 수율

홍화 추출물로부터 활성성분의 분리까지 수율을 조사하였다(Fig. 42).

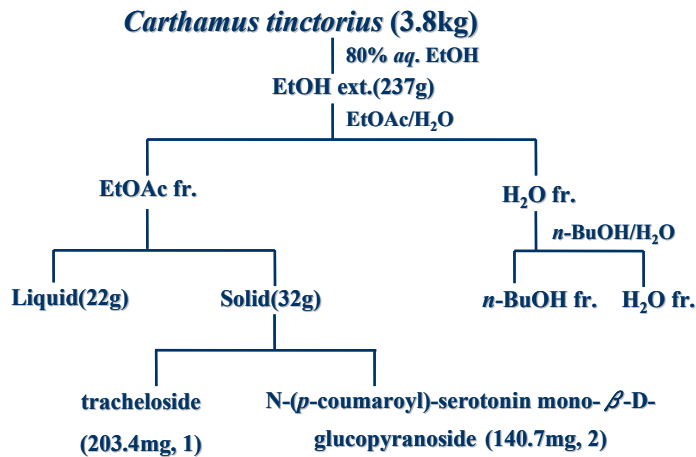


Fig. 42. Yield of osteo-active material isolated from safflower(*Carthamus tinctorius* L.)

홍화 3.8Kg으로 ethanol 추출시 고형분 237g을 얻었으며 용매분획후 활성 분획인 ethylacetate 분획의 경우 32g을 얻었다. Ethylacetate 분획으로부터 open column chromatography와 정제과정을 거쳐 동정한 경우 활성성분 tracheloside 203.4mg, N-(*p*-coumaroyl)serotonin mono- β -D-glucopyranoside 140.7mg을 얻었으며 수율은 각각 0.005%, 0.004% 였다. 이는 정제과정에서 물질동정과 순수정제를 위하여 인접 fraction의 tracheloside, glucopyranoside 양이 제거되었으므로 홍화내 총량을 의미하지는 않는다. 본과제에서 두 성분의 동정은 홍화 골강화의 핵심성분 구명과 제품의 생산공정상의 표준물질로 활용하기 위한데 의의가 있다. 활성성분이 제약으로 개발되는것은 목적성분만을 위한 다량수득 공정, 유도체개발, 기타 화합물과 활성의 비교 등 별도 조건과 과정이 필요할 것이다. 본과제는 이를 위한 기초로서 활용할수 있을 것이다.

제 8 절 활성성분의 초임계 추출

1. 활성성분의 초임계 추출

홍화의 용매 추출에 의한 미지의 골강화 성분 활용, 존재확인과 더불어 골강화 중간 기질로 알려진 linoleic acid 및 인지질을 추출하여 활용하고자 하였다. 추출법을 다양화하기 위하여 용매회수비용 절감, 성분보존성에서 장점이 있는 초임계추출을 시행하였다. 초임계유체(supercritical carbon dioxide)를 50°C, 5000psi에서 CO₂를 2500L까지 순차적으로 회전하여 추출하였을 경우 7개의 추출 Fraction을 얻었다.

2. 지방산의 분석

글세포 활성화 및 칼슘흡수 촉진인자로서 linoleic acid의 회수정도를 gas chromatography로 분석하였다. Fraction 1~7의 지방산 조성은 Table 27과 같다.

Table 27. Fatty acid composition of Safflower oil by supercritical carbon dioxide extraction

FA profile	Unit : %						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
14 : 0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
16 : 0	6.3	6.4	6.2	5.9	5.6	5.4	5.5
16 : 1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
18 : 0	1.6	1.7	1.7	1.9	2.1	2.2	2.2
18 : 1	10.3	10.7	10.8	11.1	11.8	11.8	11.9
18 : 2	81.3	80.9	81.0	80.8	80.3	80.4	80.1
18 : 3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

초임계추출한 홍화추출물의 지방산 함량 조성은 Fraction에서 linoleic acid가 80%이상으로 가장 높았으며 oleic acid 10% 기타 palmitic acid 5%~6%, stearic acid가 1%~2% 등으로 나타났다. 홍화의 저분자 성분과 함께 골강화 촉진성분으로서 linoleic acid의 활용 가능성을 확인하였다.

3. 인지질 함량분석

조골세포 활성화에 기질물질인 인지질의 함량을 ICP(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer)로 분석한 결과는 Table 28과 같다.

Table 28. Phosphate content of Safflower residue and oil by supercritical CO₂ extraction
Unit : mg/100g

Sample	Phosphate content
R-1	647.8
R-2	620.6
F1 ~ F7	none

R: Residue, F: Fraction
F1~F7 불검출

초임계 추출후 Fraction과 추출박의 인지질 함량을 분석한 경우 Fraction에서는 중성지질외에 인지질이 검출되지 않았으나 추출박에서는 인지질이 100g당 620mg 검출되었다. 인지질은 골강화 작용시 중간기질 활성화 가능성이 있으므로 추출박에서 인지질을 회수하거나 추출박을 고형으로 활용할수 있다. 골강화 활성성분을 가공시 용매추출에서 활성이 높은 저분자 핵심성분을 활용하고 추출법을 다양화하여 초임계 추출로 리놀렌산, 인지질 등 촉진인자를 얻어 제품을 구성할수 있으며 이를 위한 기초를 구축하였다.

제 9 절 활성추출물의 산화안정성

홍화씨에는 지질이 다량 함유되어 있으며 지질 함량은 35~40% 이다. 홍화씨의 구성 지방산은 필수 지방산인 linoleic acid 함량이 약 80%로 높은 편이다. 홍화유의 비중은 0.922 - 0.927, 굴절율은 1.468 - 1.469, 발연점은 210°C, 융점은 -15°C이며, 요오드가는 140 - 152이다. 홍화의 지방산 함량이 높아 산가가 높으며 가공소재로 사용시 산패 등의 방지를 필요로 한다. 홍화의 가공시 탈산매체 등을 활용할 수 있으며 음료 등의 소재로 활용할 경우는 산화방지제의 선택이 요구된다.

1. 자동산화에 의한 홍화유의 산화안정성

1.1. 항산화제 처리와 과산화물가 변화

홍화유의 저장 중 산화안정성은 60°C의 incubator를 이용하였다. 높은 온도에서는 hydroperoxide가 분해되므로 100°C에서 산화된 오일의 과산화물가는 의미가 없다는 보고가 있다. 항산화제 종류에 따른 홍화유의 저장 중 과산화물가 변화는 Fig. 43과 같다.

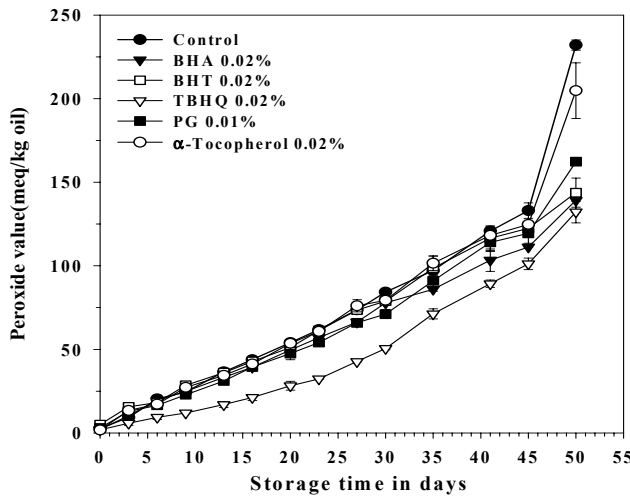


Fig. 43. Peroxide value of safflower oil stored at 60°C

항산화제를 첨가하지 않은 대조구의 과산화물가는(초기값=2.31) 저장 45일까지 꾸준히 증가하다가 그 이후에는 급격하게 증가하여 저장 50일 후에는 220.0 meq/kg 까지 상승하였다. BHA 0.02% 첨가구는 저장 23일까지는 대조구와 비슷하게 증가하였으나, 그 이후에는 증가 폭이 둔화되어 저장 50일 후에는 139.13 meq/kg으로 38%의 산화 억제율을 나타내었다. BHA 산화억제는 과산화물 형성을 억제하기보다는 형성된 과산화물가의 분해를 촉진하는 것으로 판단한 보고와 유사한 경향이였다. BHT 0.02% 첨가구, PG 0.01% 첨가구, α-tocopherol 0.02% 첨가구는 저장 41일까지 대조구와 유사하게 증가하였으나

저장 50일 후에는 각각 143.77, 162.27, 204.75 meq/kg으로 37%, 27%, 7%의 억제율을 보였다. 천연 항산화제인 α -Tocopherol은 BHA나 BHT보다 항산화 작용이 대체로 약한 것으로 알려져 있으며, 이상의 결과는 미강유에서의 연구 결과와 유사 하였다. TBHQ 0.02% 첨가구는 저장 기간동안 가장 완만한 증가를 보였으며 저장 50일 후에는 132.17 meq/kg으로 41%의 산화억제율을 나타내어 실험에 이용된 항산화제 중 가장 좋은 항산화 효과를 보였다. 이는 대두유를 기질로한 보고와 동일하였으며 불포화도가 큰 식물성 유지에 TBHQ가 효과적일 수 있다는 보고와 일치한다.

1.2. 항산화제 처리와 산가변화

항산화제를 처리한 홍화유의 저장중 산가의 변화를 측정한 결과는 Fig. 44와 같다.

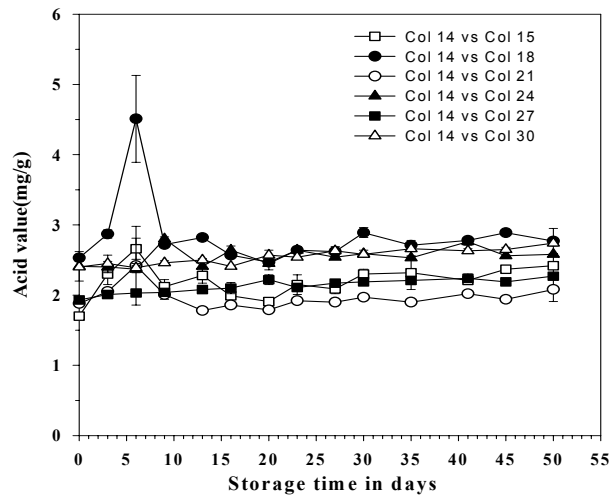


Fig. 44. Acid value of safflower oil stored at 60°C

산가는 유지 고유의 특성은 아니며 유지 분자들의 가수분해에 의해서 형성된 유리 지방산의 척도이다. 따라서 정제 정도와 산패 진행 정도를 나타

내며 유지의 맛과 냄새에 큰 영향을 미친다. 본 실험에서 각각의 시료의 산가는(초기값 1.70~2.53) 저장 기간동안 약간의 증가, 감소 등의 과정을 반복하면서 저장 50일 후에는 2.08~2.77로 미미하게 증가하는 추세를 보였다. 한편 저장 기간동안 BHA 0.02% 첨가구, TBHQ 0.02% 첨가구, α -Tocopherol 0.02% 첨가구의 산가는 실험 대조구, BHT 0.02% 첨가구, PG 0.01% 첨가구보다 전반적으로 높은 값을 보였다. 이상의 결과를 고려해 볼 때, 홍화유의 산패 정도는 자동 산화 과정에서 생성되는 hydroperoxide(ROOH) 함량의 측정에서 그 변화의 관찰이 용이하며, 실험에 사용된 항산화제 중에서는 TBHQ의 첨가가 산패 억제에 효과적이었다. 토크페롤류의 항산화 작용은 BHA나 BHT와 같은 합성 항산화제들의 경우와 비교할 때 상대적으로 상당히 약한 것으로 알려져 있다. 그러나 토크페롤류는 사용이 용이하며 인체에 무해한 천연 항산화제라는 장점을 가지고 있다. 따라서 α -Tocopherol에 TBHQ를 혼합하여 산화 안정성의 개선 효과를 알아본 결과, 대조구의 과산화물가는 저장 일수가 길어질수록 빠르게 증가하는 반면 항산화제 처리구는 완만한 속도로 증가하여 저장 21일 후에는 각각 116.33, 39.00 meq/kg으로 69%의 억제율을 보였다(Fig. 45).

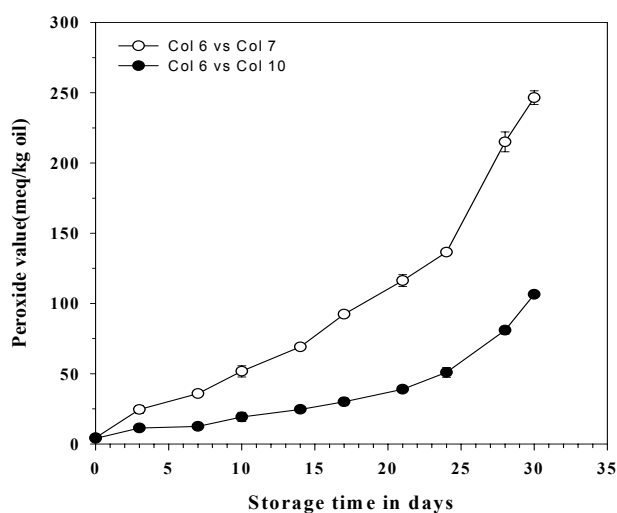


Fig. 45. Peroxide value of safflower oil stored at 60°C

제 10 절 활성성분의 소재화 활용기술

1. 홍화 소재의 골강화 제품화를 위한 Formulation

홍화를 활용한 골다공증 예방 및 치료효능을 가진 건강 기능성 조성물을 Table. 29와 같이 조제하였다.

Table 29. Composition of base material for osteo-active product

Components	Content(%)
Safflower	24.0
Plant extracts	42.0
Ca	20.0
P	10.0
Mg	1.8
CPP	2.0
Vitamin D ₃	0.2
Total	100

홍화씨 및 골강화 보조용 식물부재료를 기초로하였다. 칼슘, 인산과 마그네슘 비율이 골기질에 영향이 있다는 보고에 따라 이온화 칼슘과 인산염 및 스테아린산 마그네슘을 첨가하였다. 그 외 무기질 생성 촉진효과로서 CPP, 기타 관련 비타민으로서 vitamin D₃가 조성의 기초가 될 수 있다.

2. 액상제품 개발을 위한 골강화 활성성분의 수용액내 분산

2.1. 홍화의 경우 유지함량이 높은 등의 이유로 액상제품 개발이 없었다. 본 과제에서는 차기년도 골강화 가공품 가운데 액상제품 개발을 시도하기 위하여 사전 단계로서 골강화 활성성분이 포함된 추출물의 수용액내 분산조건을 예비실험 하였다. 수용액내 분산을 위한 유화제로는 아라비안검, 가라기난, 자당지방산에스테르를 0.1%~0.4% 까지 조합하며 사용하였다.

2.2. 분산도의 측정

수용액내 입자 분산성은 Formulacion사의 Turbiscan을 사용하여 광학적으로 분석하였다. 홍화추출물의 대조구(I)와 아라비안검, 가라기난, 자당 지방산에스테르 0.1% 처리구(II), 자당지방산 에스테르를 0.7%까지 높인 처리구(III)로 하여 분산도를 조사하였다. 분산도는 분산 profile (Fig. 46), 시간당 creaming층의 이동속도 (Fig. 47)와 variation층의 back scattering의 변화 (Fig. 48)으로 나타내었다.

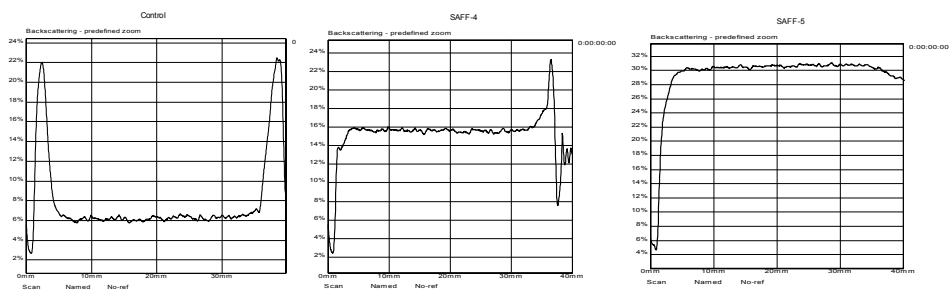


Fig. 46. Emulsion properties of Safflower extract in the aqueous portion.

처리구의 하층부부터 상층부까지 Scanning한 profile은 대조구 I의 경우 BS(backscattering)가 하층부와 상층부에서 높았다. 이는 BS와 반비례하는 빛의 이동경로 λ^* 가 짧게 반사되었음을 의미하며 하층부는 sedimentation, 상층부는 creaming의 결과를 보여준다. 중간부분은 λ^* 가 충분히 반사후 돌아와 이동경로가 긴 variation으로서 입자가 거의 없음을 보여준다. 즉 대조구는 shaking 즉시 침강과 부유로 나뉘며 골강화 활성소재가 분산되지 않았음을 나타낸다. 유화제를 처리한 처리구II는 하층부의 경우 variation을 나타내어 분산성을 나타내었으나 상층부의 경우 BS가 증가하여 부유상태가 잔존하였다. 처리구 III는 전체 용액상태에서 variation이 일어났으며 BS가 일정하게 고르게 분산되었음을 나타내었다.

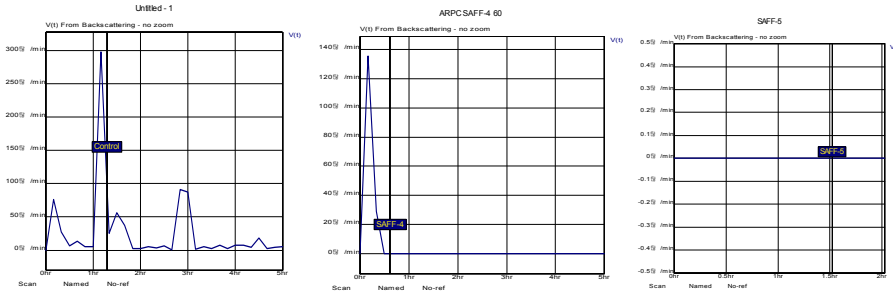


Fig. 47. Migration velocity of Safflower extract in the aqueous portion.

부유상태층을 분석하여 시간당 상층부로의 creaming 이동속도 (migration velocity)를 분석하였다. 대조구 I 은 시간 경과에도 지속적으로 이동 peak가 나타남을 보여준다. 처리구 II는 초기에 이동후 안정화함을 나타내었다. 처리구 III는 shaking 초기부터 creaming의 이동없이 고른 분산으로 안정화를 보여주었다.

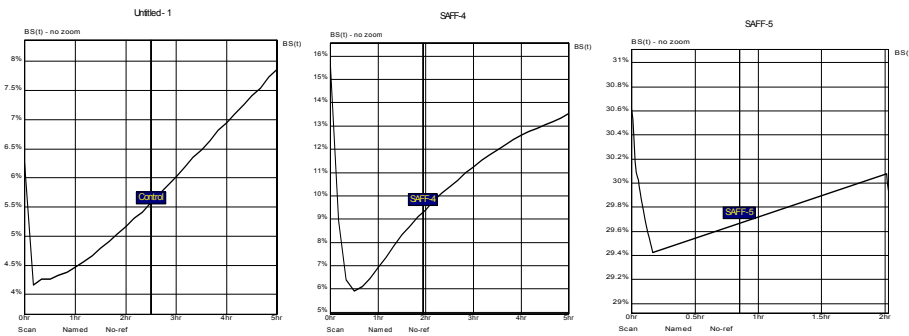


Fig. 48. Variation properties of Safflower extract in the aqueous portion.

Variation층을 분석하여 시간당 BS의 변화를 분석하였다. 대조구 I 은 시간 경과 따라 BS가 지속적으로 증가함을 나타낸다. 즉 중간 variation에서 λ^* 가 감소함을 알수 있으며 이동거리가 짧아진것은 입자들이 뭉친 결과로 보여진다. 처리구 II는 BS의 증가속도가 대조구보다 완만하였으며 처리구 III는 BS 증가속도의 기울기가 가장 완만하여 입자의 뭉치는 속도가 작고 시간이 경과해도 상대적으로 안정화도가 높음을 보여 주었다.

홍화의 가공시 기존에 액상가공이 없었으나 추출물을 분산할수 있는 결과를 얻음으로서 골강화 활성성분의 액상화 가공 기초를 준비하였다. 홍화 활성 추출물의 migration velocity, variation property별 액상화 비교를 Fig. 49 에 나타내었다.

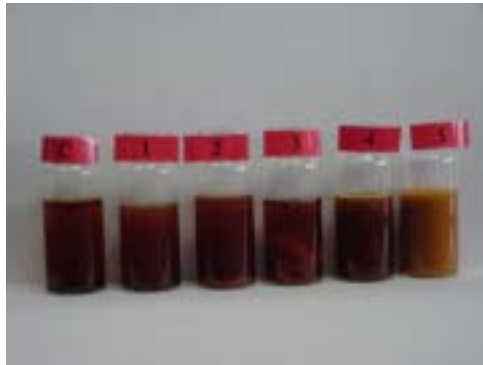


Fig. 49. Photo for suspension properties of safflower extract by emulsifier combination.

3. 분말, 환 등 고형제품의 개발

홍화 활성추출물을 이용하여 분말, 환 등 건강기능소재의 제형에 따른 가공품 제조과정을 Fig. 50에 나타내었다. 홍화 시료를 세척후 80℃에서 12시간 건조(overnight) 하였다. 180℃에서 5분 roasting하여 표면의 수분과 wax 성분을 안정화 시켰다. 상온까지 송풍냉각후 roll mill로 70회 이상 반복 분쇄하고 hammer mill로 재분쇄 한다음 180mesh 처리하여 분말 시료를 제조하였다. 환은 배합반죽, 성형, coating 및 포장의 단계로 제조하며 배합 반죽은 Roll mill로 2회 반죽한 다음 압출과정을 거쳐 약 30cm 장방형으로 압출하였다. 성형은 자환기를 이용해 면의 형태로 성형하고 제환기로 1차 성형을 하고 정환기를 통해 2차 성형을 거쳐 환의 형태로 하였다. Coating 및 포장은 성형 후 건조하여 꿀 또는 셀락을 이용하여 표면을 코팅하여 포장하였다.

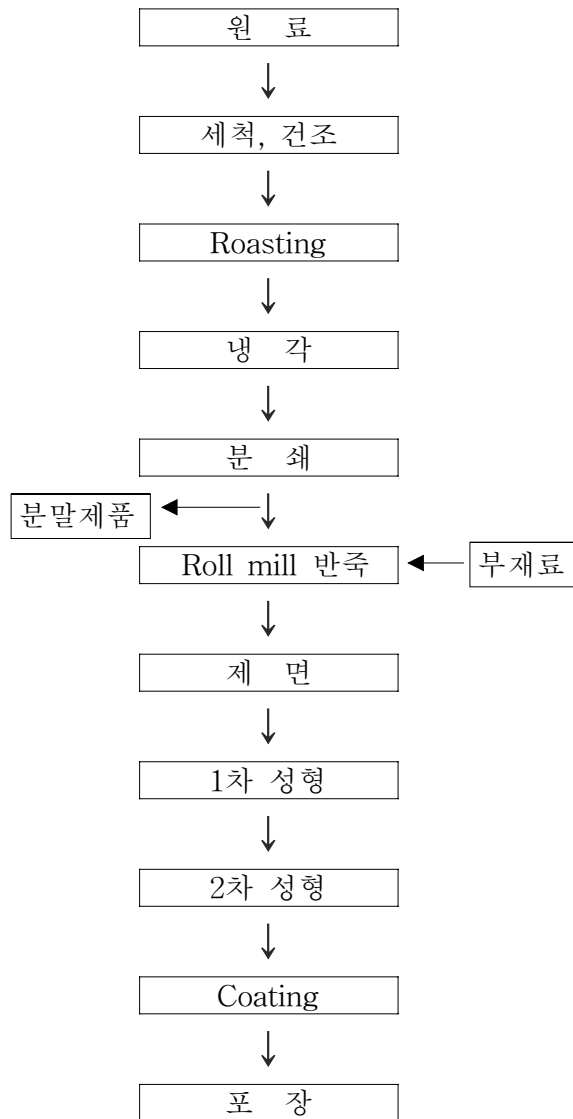


Fig. 50. Process for flour and pill from safflower extract



Fig. 51. Photo for processing product of raw, pill and flour of safflower

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 골강화 활성 시스템 구축

골강화 활성을 측정할수 있는 시험계로는 세포계와 실험동물을 이용하는 방법이 있으며 두 시험계 모두를 구축하였다. 세포계로는 인간유래 세포계로서 Saos-2를 이용한 시험계와 임신한 쥐의 태자로부터 Calvarial cell을 배양한 세포 시험계를 준비하였다. 동물시험계로는 난소를 절제수술한 암컷 흰쥐와 사료의 무기질 식이를 조절한 수평아리로부터 골다공증을 유도한 시험계를 준비하였다.

2. 홍화의 골강화 활성 검색

각 시험계는 활성을 나타내는 대사방식에서 각기 다른 특성을 나타내므로 대상시료인 홍화의 골강화 활성을 명확하고도 다각적으로 평가하기 위하여 난소절제 흰쥐, 수평아리 및 세포계 등을 활용하여 교차검증 하였다. 홍화의 골강화 활성을 검색하기 이전에 식품으로서 안전성을 우선 검색하였다. 세포의 MTT 염색법과 동물의 간 신장에 대한 혈액지표인자 분석으로부터 홍화의 생체에 대한 무독성을 확인하였다. 세포의 증식성, 효소지표(Alkaline phosphatase), collagen 합성능 등으로부터 홍화의 골강화 효과를 확인하였다. 동물시험계로부터는 홍화 투여에 의한 골 강도 증가와 혈액의 효소인자(ALP) 활성화를 흰쥐와 수평아리 시험계에서 확인하였다. 홍화의 골강화 효과는 호르몬계(난소절제흰쥐), 칼슘계(무기질 조절 수평아리) 모두에서 나타났으며 칼슘의 세포내 흡수와 이용에 보다 촉진 효과가 있는 것으로 보였다. 동물계 실험에서 길항작용 등에 의한 결과해석의 확인 필요성은 세포계 시험으로부터 보다 명확히 할수 있었다. 골관련 유전자 발현으로 세포실험의 경향과 관련 유전자에 의한 기전 등을 해석하였다.

3. 국산 및 외산 비교 및 활성성분 추출

시료는 참여기업인 홍화영농조합으로부터 계약재배에 의하여 순수 국산 시

료를 확보하였다. 국산 홍화는 외산(중국산)과 비교하여 세포 증식능과 골강화 활성에서 우위를 보였다. 이는 품종과 재배환경의 차이에서 기인한 것으로 판단하였다. 활성성분은 물질을 광범위하게 추출하는 조건으로서 80% 에탄올로 추출하였다. 에탄올 추출물을 대상으로 활성이 확인되어 식품으로 가공이 가능하였으며 추출공정과 회수 등의 지원이 보장되어야 한다. 용매분획과 정제에 의한 핵심성분의 추출도 제시되었으며 이의 활용은 독성시험 등 보다 진전된 새로운 연구단계를 요구하며 관련법규와 부합하는 방향으로의 개발을 필요로 한다. 홍화유의 골관련 성분을 초임계 추출법으로 조건을 확립하여 장치의 생산비용 절감시 유용한 활용방안을 제시하였다. 활성성분을 보다 세밀하게 추출하기 위하여 물질 Profile을 분석한후 Butanol 분획추출법으로 Hexane, Ethylacetate, Butanol, 물로 분획하고 각 분획을 대상으로 전개비율이 가장 양호한 조건을 설정하였다. 활성분은 발색시약으로 정성분석하고 분리, 정제하여 핵심성분을 추출, 동정하였다.

4. 홍화 골강화 성분의 이화학적 특성 및 가공특성

홍화 골강화 성분의 농도-활성관계 및 pH, 온도 안정성을 시험하여 체내 및 가공중 활성 유지를 확인하였다. 골강화 활성의 기전으로서 조골, 파골 활성 모두를 확인하였고 파골작용중 다핵세포 분화억제 특성을 구명하였다. 골강화 활성 건강제품을 위하여 소재의 산화억제, 유허나 특성과 계획대비 추가 연구로 액상분산성 조건을 확립하였다. 활성추출물을 대상으로 기본적인 조성 및 건강기능 제형으로서 분말, 환 등을 시험제조하였다.

5. 연구 성과물

연구결과를 정리하여 학술대회, 국내외 논문 투고를 하였으며 특허 출원을 준비하였다. 시제품을 바탕으로 농가형 홍화제품 개발을 지원하였으며 환, 티백차, 분말 제품 등은 전시회를 통하여 국외(홍콩 등)에 소개하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 기술적 측면

- 난치성 성인병인 골관계 질환의 표준 검색법 확립
- 홍화 골강화 활성성분의 효율적 분리기술 개발
- 과학적인 홍화 골강화 기능성 식품의 개발 및 안전성 평가 시스템 구축
- 골관계 질환에 효과적인 한국형 특용작물의 발굴 및 이용
- 홍화 골강화 성분의 농가 보급형, 환경 친화형 추출 기술 개발
- 홍화의 골기질 강화 대사계 구명
- 독성시험 및 인체실험을 통한 개별인정의 기초확립
- 제품다양화 및 국내외 기술활용

2. 경제 · 산업적 측면

- 재배 농가에 수익성 특용작물 제시
- 국산 홍화의 우수성 조사
- 용해도 향상 및 산화억제 기술개발에 따른 제품 다양화
- 성인의 골관계 보건 향상으로 국민 생산성 증진
- 국내 3,000억, 국외 100억불에 이르는 골강화 예방 및 치료 시장에 참여
- 골관계 기질을 강화하는 한국형 특용작물의 제시 및 보호
- 새로운 개념의 과학화된 골기질 강화 치료제 또는 기능성 소재 개발
- 국내외 공동연구를 통한 소재의 응용
- 홍화의 골강화 활성 검색 및 응용기술의 국내외적 권리 확보 및 영농단체, 산업계 등의 기술적 애로 해소 및 응용 기술이전

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

홍콩 국제식품 전시회 현황과 골관련 건강제품 현황을 조사하였다. 개최 기간, 규모 및 개요는 다음과 같다.

(가) 전시회 개요

개최기간 : 2003. 8. 14 - 2003. 8. 18

개최장소 : Wanchai Hongkong Convention & Exhibition Centre

주 관 : 香港貿易發展局(Hong Kong Trade Development Council)

참가업체수 : 170개 업체 (홍콩 120, 중국 31, 한국 16, 호주 1, 캐나다

2)

참관인원 : 총 22만명

전시장 구성 : 26,500m² 전시장에 8개 분과구역으로 구성

전시분과 : ■Bakery products,

■Beverages and Restaurant,

■Biscuits, Snacks and confectionery,

■Canned, Frozen & Convenience Food,

■Health Food & Ginseng Products,

■Sauces & Seasonings,

■Chinese Mainland Pavilion,

■Korea Pavilion

(나) 전시품목 및 특징

● 제과, 제빵, 음료, 스낵, 통조림, 육·수산 가공식품, 인삼 및 건강식품, 소스 및 향신료 등이 전시되었음. 일반가공식품은 홍콩 상표이나 대부분 저비용의 중국 식품회사와 임가공 계약한 제품으로 보이며 가공기술, 용기, 포장, 디자인 등에서 국산제품보다 열악한 것으로 고려하였음. 국산 가공기술의

연구 발전이 지속될 경우 제품 경쟁력은 유지할 것으로 판단함.

● 전시품목 가운데 다수 업체가 공통적으로 전시한 품목은 영지, 운지, 송이 등 버섯류, 인삼, 반건조 제비집으로서 금번 전시회의 특징적 제품군이라 할수 있음. 이는 세가지 식품이 홍콩 및 주변 지역에서 다수 소비되는 원료임을 반증하며 원료상태로 유통되므로 가공제품의 개발과 수출에 참고할수 있음.

● 전시회의 개념이 제품의 홍보, 기술성 제시, 계약상담 보다는 물건을 구매하는 장터와 같았음. 소비자와 함께하는 대중화된 전시의 의미도 있으나 만원 인파(주최기관 파악인원 1일 44,000명)가 제품사향 조사보다는 시음 및 할인구매에 집중하였음.

● 한국관의 식품회사 및 전시제품으로는 인삼공사, 농협 등의 인삼제품, 대한식품, 삼원산업, 경남무역 등의 김, 쥐치포 등 수산건제품, 국제식품 등의 농축차, 부여군, 농심, 두산농산의 김치제품 등이 있었으며 김 제품이 관심과 소비자 호응도가 높았음.

(다) 건강기능성 식품

● 건강기능성 제품은 식품보다는 의약으로 분류하는 경향이 있었으며 따라서 식품에서의 기능성은 가공보다는 원료형태가 주류를 이루었고 연구결과 보다는 민간 및 고서의 기능을 인용하였음.

● 건강을 표방한 제품군은 인삼, 녹용, 버섯류, 제비집, 식물유래 차 등이 있음. 제품, 출품회사 및 신체유효성은 다음과 같음. (Xylitol, Propolis를 제외하고는 모두 홍콩업체로서 영문회사명을 소개하였음.)

- 인삼·녹용 : 미국산 화기삼(Pakshingtong Co. Ltd., Hong Fook Tong Holdings), 원기회복 고원생육 삼칠포자차(Notoginseng, Pilpolbiological Co. Ltd.) 면역활성 증강

- 영지·운지버섯 : Cents Co. Ltd., Oriental Products Co. Ltd.

Longfar Pharmaceutical Ltd., Purapham International Ltd., 보양, 혈액순환, 체중조절, 발모 및 변색방지

- 송이버섯 : Kwong Tai Hong Sealand Co. Ltd.
- Monkey head mushroom : Honhkong Green King Food Stuff Co.
- 夏枯草 : Longsan Pharmaceutical Ltd., 근력강화, 혈압안정, 심신안정
- Vitamin jelly, candy : Lee Pharm Enterprises,
Vitagreen Health Products Co. Ltd.
- Xylitol, Propolis : SB trading Co. Ltd.
- 알로에 : National International Co. Ltd., 혈액순환
- 제비집 : Well Sun Trading Co. Ltd., Nutri Nest Co. Ltd. 등 5개

업체, 심폐기능, 해독

- 백작약, 갈근 등 : Kinto Sian Jiom Medicine Manufactory Co. Ltd.,

해열

- 곡류분말, 인삼 혼합제품 : True Taste & Medicine Emperor 등

● 한국관의 기능성 제품

- 동충하초, 비타그린 등 국산 건강음료 : Ocean Legend Holdings (현지 대행사)

- 홍삼캔디 : 신화
- 백비탕 : 생생바이오

(라) 골관련 제품

- 홍화김 : 한국 별미식품, 호응도 높았음.
- 肉骨茶(星加皮) : 홍콩 Cents Co. Ltd. ,
- Licola candy(接骨之花, 흑임자, 냉몽 등) : 홍콩 Siber Hegner Ltd.

(마) 表演舞臺 개최

- 전시참여 업체의 경우 자사제품의 시연 및 홍보에 주력하였으며 학술

적 주제는 미약하였음.

● 寶威貿易有限公司의 水雲美食耀香江 등 8/14 - 8/18 까지 40개의 연단 시연이 있었으며 건강관련으로는 태산기업무역공사의 “Kawai 활용”, 임기원다행유한공사의 “차와 건강”, 의원관리국의 “건강자문회”, 건상국제학원의 “건강과 즐거움” 등의 강연이 있었음.

(바) 기타사항

● 별도의 행사로 “International Conference & Exhibition of the Modernization of Chinese Medicine & Health Product(ICMCM)”가 동시에 개최되었음. 의약 및 약초의 약효 등을 주제로 학술과 무역 행사가 진행되었으며 국내에 식품으로 허용된 식물이 확인될 경우 추후 활성 및 가공에 대하여 관심을 가져볼수 있음. 골관련은 上海第一醫藥有限公司의 골상유합제, 천연진주농축액, 영지포자 상품이 소개되었으며 그 외에 中醫藥의 건강제품은 北京同仁堂國際有限公司(Beijing Tong Ren Tang International Co. LTD.)를 비롯한 14개 회사에서 출품하였고, 健康製品은 American Oriental Bioengineering Inc을 비롯한 13개 회사에서 출품하였음. 葛根의 뇌혈관 순환 및 차의 효능은 임상실험 결과를 제시하기도 하였음.

7. 약재상가 및 홍화관련제품 조사

(가) Shungwan, Desbreux West, Bonham, 등 약재상가에서 대중적 약재 및 홍화제품 현황을 조사하였음.

(나) Shungwan의 順豐蔘棗行(Shun Fung Ginseng Co., 黃達波, 2599-1129), Desbreux West의 耀成貿易公社(Yui Sing Trading Co. Ltd., 黎國耀, 2805-2017), Bohnam의 永和興蔘棗國藥行(李寵穩, 2544-1563) 등 지역별 5개 이상의 업체를 대상으로 하였음. 대부분 경험적으로 약재의 효능을 인지하였으며 啓發茶莊有限公司(陳韻芝, 2541-6800) 만이 약재의 중국명, 영문명, 효능

등을 비교적 체계성 있게 진열하였음.

(다) 공통적으로 인삼(화기삼), 녹용, 제비집이 주 상품으로 거래되고 있었으며 홍화제품은 취급하지 않는 업체가 많았음.

(라) 홍화를 보유하고 있는 소수업체는 西紅花로서 스페인산 제품을 소개하였음. 포장(37.5g) 당 HK400\$ - HK1,000\$을 제시하였으며 제품은 홍화잎을 실타래처럼 말린 제품으로서 열악하였음. 용량에 비하여 고가를 제시하였으나 용법, 효능에 대하여는 인식하는 업체가 없었음.

(마) 홍화와 유사한 꽃과 씨가 업체마다 진열되어 있었으나 중국장미로 밝혀졌으며 피로, 혈액순환용으로 유통되고 있었음. 두충, Linden 등이 골과 관련있는 것으로 현지에서 알려져 있으나 대중화되어 있지는 않으며 탕제 등 복합약제에 소재로 활용되는 정도임.

(바) 홍화 자체가 대중적으로 시장에 유통되고 있지 않았으며 효능소개 및 가공제품은 없었음. 대중음료 가운데 雞骨茶가 있었으나 해독, 기혈보호, 위장보호 등 골과는 관련없는 효능으로 유통되고 있었음. 그러나 Kowloon 시내 양약국에서 骨傷에 바르는 제품가운데 홍화유 제품 (사진)이 있는 것을 발견하였음. 이로부터 일반적으로 식품으로는 사용하지 않으나 약리적으로는 미약하나마 홍화의 골관계 활용을 인식하고 있는 것으로 추론하였음.



Fig. 52. Photos of safflower spread oil for sprained body

(사) 홍콩 약재상가 조사로부터 다이어트 붐 및 고령화와 함께 홍콩사회의 골 건강에 대한 관심이 있는 것으로 판단하였음. 국산 홍화의 골강화 활성 결과와 함께 홍화유, 분말, 환, 정제 등 가공제품의 소개는 시장적용 가능성이 있는 것으로 고려함. 홍콩의 홍화제품 동향 내용을 참여업체와 협의하고 제품소개 및 개발방향을 협의할 계획임.

8. 수집자료 및 제품

- (가) 식품박람회 전시편람
- (나) ICMCM Catalogue
- (다) 홍화유 및 한방음료
- (라) 약재상가 주소 및 홍화관련 무역상 연락처

제 7 장 참고문헌

1. 박민영. 2000. 어린 병아리에서 isoflavones의 섭취가 골격 발달에 미치는 영향. 고려대학교 대학원 석사학위논문.
2. 김기수:대한내분비학회 10주년 심포지움 논문집,pp35-48,1996
3. 孫思邈 :備急千金要方, 서울, 大星文化社, p607 ,1991
4. 全國 韓醫科大學 再活醫學科 教授室編 : 東醫再活醫學科學 書苑堂 pp.26-37, p.48, pp.181-184, 1995
5. 王昆: 醫方集解, 서울, 大成文化社, pp.313-314, 1992
6. 최태섭. 1990. 한국의 보약. 도서출판 열린책들. p. 183.
7. Adlercreutz C. H., Goldin B. R., Gorbach S. L., Hockerstedt KAV, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT, Hase TA, Fotsis T. 1995. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr* 125:757S ~ 770S.
8. Adlercreutz H., Markkanen H., Watanabe S., 1993. Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet* 342(8881):1209 ~ 1210.
9. Adlercreutz H., 1990. Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest* 50(suppl)210:3 ~ 23.
10. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., 1997. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J Biol Chem* 262:5592 ~ 5595.
11. Alekel D. L., Germain A. S., Peterson C. T., Hanson K. B., Stewart J. W., Toda T., 2000. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72:844 ~ 852.
12. Anderson J. J., Ambrose W. W., Garner S. C., 1998. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc*

- Soc Exp Biol Med* 217(3):345 ~ 350.
13. Andrew B, Grey M. B., Joanne P., Stapleton R. GON, Margaret C, Evans, Michele A, Tatnell, Ruth W, Ames NZCS, Ian R, Reid. The effect of the antiestrogen tamoxifen on bone mineral density in normal late postmenopausal women. *Am J Med* 99:636 ~ 641.
 14. Arjmandi B. H., Alekel L., Hollis B. W., Amin D, Stacrewicz–Sapuntzakis M., Guo P., Kukreja S. C., 1996. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126:161 ~ 167.
 15. Arts J., Kuiper G. G., Janssen J. M., Gustafsson J. A., Lowik C. W., Pols H. A., van Leeuwen J. P., 1997. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV–HFO cells. *Endocrinol* 138:5067 ~ 5070.
 17. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Analy. Chem., Inc., Arlington, VA.
 18. Avioli L. V., 1999. SERM drugs for the prevention of osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 10(8)317 ~ 319.
 19. A.O.C.S. Official method Ce 8–53, 4th ed., *American Oil Chemists' Society* (1990)
 20. Barkhem T., Carlsson B., Nilsson Y., Enmark E., Gustafsson J–1, Nilsson S., 1998. Differential response of estrogen receptor and estrogen receptor to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 54:105 ~ 112.
 21. Barnes S., Peterson T. G., 1995. Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:103 ~ 108.
 22. Barnes S., 1995. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr* 125:777S ~ 783S.
 23. Barnes S., 1998. Evolution of the health benefits of soy isoflavones.

Proc Soc Exp Biol Med 217:386 ~ 392.

24. Beato M., Herrlich P., Schutz G., 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851 ~ 857.
25. Benson J. R., Baum M., Colletta A. A., 1996. Role of TGF in the anti-estrogen response/resistance of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1:381 ~ 389.
26. Benson J. R., Colletta A. A., 1995. Transforming growth factor. prospects for cancer prevention and treatment. *Clin Immunother* 4:249 ~ 258.
27. Berry M., Metzger D., Chambon P., 1990. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-estrogen 4-hydroxy tamoxifen. *EMBO J* 9:2811 ~ 2818.
28. Black L. J., Sato M., Rowley E. R., Magee D. E., Bekele A., Williams D. C., Cullinan G. J., Bendele R., Kauffman R. F., Bensch W. R., Frolik C. A., Termine J. D., Bryant H. U., 1994. Raloxifene(LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93:63 ~ 69.
29. Blair H. C., Jordan S. E., Peterson T. G., Barnes S., 1996. Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 61:629 ~ 637.
30. Broulik P. D., 2000. Tamoxifen prevents bone loss in castrated male mice. *Horm Metab Res* 32(5):181 ~ 184.
31. Bellows C. G., 1986, Mineralised bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvarial cell populations, *Calcif Tiss Int*, 36, 143 ~ 154.
32. Birnbaumer L. G., 1990, proteins in signal transduction. *Ann Rev*

- Pharmacol Toxicol, 30 : 675 ~ 705.
33. Burstone M. S., 1958, Histochemical demonstration of acid phosphatase with naphthol AS-phosphate, *J Natl Cancer Inst* wq : 523 ~ 539.
 34. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR, Frolik CA, Termine JD, Bryant HU. 1994. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93:63~69.
 35. Cheng S. L. 1994, Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro : Induction of the Osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, Vol 134 : 277 ~ 286.
 36. Crook M, Swaminathan R. 1996. Disorders of plasma phosphate and indications for its measurement. *Ann Clin Biochem* 33:376~396.
 37. Corns CM, Ludman CJ. 1987. Some observations on the nature of the calcium-cresolphthalein complexone reaction and its relevance to the clinical laboratory. *Ann Clin Biochem* 24:345~351.
 38. Carusi D. 2000. Phytoestrogens as hormone replacement therapy: an evidence-based approach. *Prim Care Update Ob/Gyns* 7:253~259.
 39. Canalis E. et al, Insulin like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology*, 136: 1348–1354 1995
 40. Delany AM et al. Cortisol increases interstitial Collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol chem*, 270:26607–26612, 1995
 41. D.H. Kang, H.K. Park and D.H. Kim. Oxidative stability of deep-fried instant noodle prepared with ricebran oil fortified by adding antioxidants or by blending with palm oil. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21(3):409–418 (1989).
 42. E. Canalis. Mechanisms of Glucocorticoid action in Bone: Implications to

- glucocorticoid-induced osteoporosis, *J. Clin. Endocri. Met.*, 81,3441-3447, 1996
43. Ernesto Canalis. Effect of Glucocorticoids on Type 1 collagen synthesis, Alkaline phosphatase Activity, and Deoxyribonucleic Acid Content in Cultured Rat Calvariae. *Endocrinology* 112:931-935, 1983
 44. Ekidd P, L, Pekka, 1986. HPLC Separation and diode-array spectroscopy identification of DNA derivatives of Carbonyl Compound from Whisky. *J. of Chronol.* 353 : 163-168
 45. Erkilli, I., Fung, T., Kandiah, M., wilkins, J., Moran, J.J. and Blake, J.A. Study of the accelerated oxidation of low and high erucic rapeseed oil. *J. Am. Oil Chem. soc.*, 55:503 (1978).
 46. Frankel, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science and Technology.* 4:220-225 (1993).
 47. Ikuo, 1992, Ipriflavone inhibits murine osteoclast formation in vitro, *Calcif Tissue int.*, 51 : S7 ~ S10.
 48. J.H. Lee and N.J. Cho. Effect of the pan oil type on the releasing power, changes of peroxide and acid value of the oil. *Korean J. Food & Nutr.* 11(2):137-142 (1998).
 49. Kind PRN, King E. J., 1954, Estimation of plasma phosphate by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine, *J Clin Pathol.* 7 : 322 ~ 326.
 50. Kohei N., 1994, Effect of Ipriflavone on Expression of Markers Characteristic of the Osteoblast Phenotype in Rat Bone Marrow Stromal Cell Culture, *J Bone Miner Res.*, Vol 9, No 3 : 395 ~ 340.
 51. Kream B. E., 1986, Hormonal regulation of collagen synthesis in a clonal rat osteosarcoma cell line. *Endocrinology*, 119 : 1922 ~ 1928.
 52. Kiefer MC, et al. Characterization of recombinant human insulin-like

- growth factor binding protein 4,5 and 6 produced in yeast. *J Biol chem.* 267: 12692–12699, 1992.
53. Kim, J. B., Cho, M. H., Hahn, T. R. and Pail, Y. S. (1996) Efficient purification and chemical structure identification of carthamin from *Carthamus tinctorius*. *Agric. Chem. Biotechnol.* 39, 501–505.
 54. Ke, P.J., Nash, D.M., and Ackman, R.G. Mackerel skin lipids as an unsaturated fat model system for the determination of antioxidative potency of TBHQ and other antioxidant compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54(10):417 (1977).
 55. Lane N. E., 1998, Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid –induced osteoporosis, *J Clin Invest*, Vol 102 :1627 ~ 1633.
 56. Lee S. K., 1994, Studies on the Mechanism of desensitization of the Parathyroid Hormone–stimulated calcium signal of UMR–106 Cells : Reversal of desensitization by Alkaline phosphatase but not by protein kinase C downregulation, *J Bone Miner Res*, Vol 9 : 781 ~ 789.
 57. Lowry O. H., 1954, The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme measurements, *J Biol Chem*, 207 : 19 ~ 37.
 58. Lee, T. B. (1989) *Illustrated flora of Korea*, Hyangmunsa, Seoul, Korea.
 59. Majeska, 1982, Alkaline phosphatase inhibition by parathyroid hormone and isoproterenol in a clonal rat osteosarcoma cell line : Possible mediation by cyclic AMP. *Calcif Tissue Int* 34 :59 ~ 66.
 60. Mosmann, T. 1978. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods*.
 61. M. Ahlstrom, Rapid kinase A., 1997. –Mediated activation of cyclic AMP –phosphodiesterase by parathyroid hormone in UMR–106 osteoblast–like cells, *J Bone Miner Res*, Vol 12 : 172 ~ 178

62. Min, D.B. and Wen, J. qualitative and Quantitative effects of antioxidants on the flavor stability of oil. *J. Food Sci.* 48:1172 (1983).
63. N. Kergosien, 1998, Gene and protein expression during differentiation and matrix mineralization in a chondrocyte cell culture system, *Calcif tissue Int*, 62:114 ~ 121.
64. Namba, T, (1986) Coloured illustrations of wakan-yaku, 1st ed., Vol 2, Hoikusha Publishing Co., Ltd., Osaka, Japan.
65. Nishibe, S., Sakushima, A., Hisada, S. and Inagaki, I. (1972) Tracheloside from the seeds of *Carthamus tinctorius*. *Phytochemistry*. 11, 2629.
66. Oursler MJ et al. Glucocorticoid-induced activation of latent transformation growth factor-beta by normal human osteoblast-like cell. *Endocrinology* 133: 2187-2196, 1993
67. Oshio, H., H. Inouye. 1981. Iridoid Glycosides of *R. glutinosa*. *Phytochem.* 21 : 133-138
68. P. Urea et al. Regulation of PTH /PTH related peptide receptor Messenger ribonucleic acid by glucocorticoids and PTH in ROS 17/28 and OK cell. *Endocrinology*,134, 451-456,1994
69. Rath NC, Huff WE, Balog JM, Bayyari GR. 1996. Effect of gonadal steroids on bone and other physiological parameters of male broiler chickens. *Poul Sci* 75:556~562.
70. Su-Li Cheng et al. Differentiation of human Bone Marrow osteogenic stromal cells in vitro : Induction of the osteoblast phenotype by Dexamethasone. *Endocrinology* 134: 277-286, 1994
71. Seiki Wada et al. Regulation by Calcitonin and Glucocorticoids of Calcitonin Receptor Gene Expression in Mouse osteoclast. *Endocrinology* 138: 521-529, 1997
72. S. Gronthos, 1999, Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in

- primary cultures of human bone cells, *J Bone Miner Res*, 14:47~56.
73. Turner RT, Evans GL, Dobnig H. 2000. The high-affinity estrogen receptor antagonist ICI 182, 780 has no effect on bone growth in young male rats. *Calcif Tissue Int* 66(6):461~464.
74. Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. 1987. The effects of ovariectomy and 17-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res* 2:115~122.
75. Vedi S., Croucher P.I., Garrahan N.J., Compston J.E. Effect of hormone replacement therapy on cancellous bone microstructure in postmenopausal woman. *Bone* 19, 69-72, 1996
76. Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL. 1988. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinol* 123:681~686.
77. Yamaguchi M, Gao YH, 1998. Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochem pharmacol* 55:71~76.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.