

(뒷면)

(앞면)

재래귤 유래 항염증 천연활성물질 발굴 및 제품화에 관한 연구

농림축산식품부

↑
3cm
↓

발간등록번호
11-1543000-000391-01

5cm
↓

재래귤 유래 항염증 천연활성물질 발굴 및 제품화에 관한 연구(재래귤 추출물의 활성물질프로파일링 및 추출물의 세포변이조절 효능 연구)
(Investigation and commercialization of anti-inflammatory phytochemicals originated from Jeju traditional Citrus)

제주대학교

↑
9cm
↓

농림축산식품부

↑
4cm
↓

주 의
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕계열)

↑
6cm
↓

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “재래굴 유래 항염증 천연활성물질 발굴 및 제품화에 관한 연구” 과제 (“재래굴 추출물의 활성물질프로파일링 및 추출물의 세포변이조절 효능 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2014 년 03 월 11 일

주관연구기관명 : 제주대학교

주관연구책임자 : 김소미

세부연구책임자 : 김소미

연 구 원 : 문정용

연 구 원 : 김현지

연 구 원 : 트란 안 타오

협동연구기관명 : 한국식품연구원

협동연구책임자 : 정승원

위탁연구기관명 : 경희대학교

위탁연구책임자 : 안광석

요 약 문

I. 제 목

재래굴 유래 항염증 천연활성물질 발굴 및 제품화에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 최종 목표는 제주도 재래감굴의 생리활성과 그 성분을 규명하고, 기능성식품 소재 개발에 대한 가능성을 제시함으로써, 재래감굴 소비확대를 유발하고 재래감굴의 천연활성 소재를 이용한 고부가가치 혼합조성물 개발하는 데에 있음.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 용매추출과 초임계 추출법에 의한 천연활성물질 (phytochemicals) 추출 조건 최적화
- GC-MS/MS, LC-MS/MS를 이용한 추출물 프로파일링 및 생리활성물질의 분리정제 및 성분 분석
- 동물세포계 (*in vitro*), 실험동물계 (*in vivo*)를 이용한 재래굴 추출물의 항염증효능과 세포변이억제효능 탐색 및 활성화에 기여하는 천연활성물질 (phytochemicals) 발굴
- 재래굴 유래 천연활성물질 (phytochemicals)의 항염증 및 세포변이조절 효능 기작 구명
 - 세포사멸 기작 및 NF- κ B의 활성화 억제작용기전 구명
 - 기존에 개발된 항염제와 재래굴 유래 천연활성물질 혼합제제의 상승적 작용기전 구명
- 재래굴 유래 항염증, 세포변이조절 소재를 이용한 기능성제품개발
 - 부원료 선정 및 적정 원료배합비율 최적화, 제조방법에 따른 품질특성 연구

IV. 연구개발결과

- 재래감굴 성숙과 추출물의 세포변이억제 효능 및 성분분석
 - 주원료 선정을 위한 성숙과 추출물의 암세포증식 억제 및 암세포사멸 효능을 평가했으며 열수추출물과 80% 에탄올추출 방법에 의한 제주 재래감굴 추출물은 암세포에 대한 항암효능이 크게 나타나지 않는다는 것을 확인함.
 - 이예감, 당유자, 팔삭 초임계 추출물을 확보하고 GC/MS를 통한 재래 감굴 초임계 추출물 성분을 분석함.
- 재래감굴 미성숙과 초임계 추출물의 세포변이억제 효능 및 성분분석
 - 미성숙 재래감굴의 열수, 80% 에탄올 추출물들에 대한 세포증식 억제 효능 평가
 - 미성숙 이예감, 당유자, 팔삭 초임계 추출물을 확보하고, GC/MS를 통한 재래 감굴 초임계 추출물 성분을 분석함.
- 재래굴의 다양한 추출물에 대한 대식세포의 세포독성 측정
 - 재래굴의 다양한 추출물에 대한 대식세포의 세포독성 측정하고 재래굴의 과피 추출물에 대한 LPS로 유도된 산화질소 억제능을 확인함.

- 구아바 잎 분획물의 항산화효능 탐색
 - 구아바 잎의 다양한 용매 추출물을 확보하고 구아바 잎 분획물들에 대한 항산화 효능 비교 탐색
 - 산화 스트레스에 의해 유도된 DNA damage에 대한 구아바 잎 분획물들의 세포 보호 효능을 확인함
- 인진쑥으로부터 분리된 Capillarisin의 항염증 효능 탐색 및 항암 기전 규명
 - 동물세포계 (*in vitro*)를 이용한 Capillarisin의 항염증효능을 평가하고 apoptosis 유발에 의한 암세포사멸 기작을 확립함.
- 당유자 과피 에센셜 오일에 의한 U373MG 세포에서의 세포 증식 억제 및 세포사멸 효능 평가
 - 당유자 과피 에센셜 오일에 의한 U373MG 세포에서의 세포 증식 억제 효능 탐색과 당유자 과피 에센셜 오일 성분을 GC/MS로 분석함.
- 당유자 잎 분획물의 세포변이억제효능 탐색 및 활성화에 기여하는 천연활성물질 (phytochemicals) 발굴
 - 당유자 잎에서 분리한 여러가지 분획물에 대한 전립선 암세포 세포사멸기작 확인하고 Nobiletin에 의한 전립선 암세포 constitutive STAT3 활성화도 저해능 평가함.
 - Nobiletin에 의한 SNU-16 위암 세포에서의 apoptosis현상이 ER-stress 유발과 관련된 신호 전달에 기인한 것임을 밝힘.
- 이예감 과피 초임계 추출물의 세포성장 억제 및 apoptosis 활성화
 - 이예감 과피 추출물 (supercritical extracts of yeagam peel (SEYG))에 대한 다양한 암세포에서의 세포독성 측정하고 암세포에서의 constitutive STAT3 활성화도 저해능 평가 및 DU145 이종이식 마우스 모델을 이용한 생체내 (*in vivo*) 실험을 통해 항암 활성을 확인함.
- 팔삭 추출물의 항전이작용 및 기전규명
 - 팔삭 과피 추출물 (supercritical extracts of phalsak peel (SEPS))에 대한 다양한 암세포에서의 CXCR4 측정하고, SEPS에 의한 암세포의 항전이작용 기전을 확립함.
 - 팔삭 과피 추출물에서의 유효성분으로 예상되는 osthole과 auraptene에 의한 암세포 사멸 효능을 확인함.
- 팔삭과피와 구아바의 최적혼합물로부터 항염증 활성 및 기전연구
 - 동물세포계(*in vitro*)를 이용한 OM의 항염증효능
 - RAW264.7 대식세포에서 lipopolysaccharide (LPS)로 산화질소의 발생을 유도하였을 때 LPS로 유도된 산화질소의 생성이 혼합물 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인함
 - 동물 (*in vivo*)을 이용한 OM의 항염증효능
 - 동물모델에서 LPS에 의한 충격으로부터 혼합물의 보호 효과를 평가하기 위해 우리는 치명적인 내독소 혈증과 마우스의 사망률에 미치는 영향을 모니터링.
- 천연물 혼합제재를 이용한 제품 개발
 - 예비실험을 통해 우수한 항염증 활성을 나타내는 구아바와 인진쑥을 최종 부원료로 선정하였으며 추출조건에 따른 추출특성의 모니터링 및 추출조건의 최적화를 위하여 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM)을 이용하여 구아바 잎 및 인진쑥의 추출조건의 최적화를 확립.

- 항염증 활성이 우수한 기능성음료를 위한 재래감귤 팔삭 및 구아바, 인진호의 배합비 최적화
- 팔삭-구아바 혼합제재의 정제 타정용 시료 조제 및 구성약물의 품질표준화
- 주원료의 구성약물의 품질표준화
- 공정별 품질관리에 대한 항염증 활성 및 위생안전성 측정

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 우수한 활성을 나타내는 소재개발 및 그 작용기전을 규명함으로써, 고부가 가치를 지니는 항염제 개발과 이를 이용한 항암 보조제 또는 대체제 적용 가능성 확보
- 식물 고유 효능을 활용한 기능성 제품 개발 기술 확보하여 단순가공 농산물 중심의 수출제품을 고부가가치 기능성 제품으로의 전환 시도
- 재래귤의 우수성 및 차별성을 입증하여 수입산 대체하고 우리 농산물 수출에 기여

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Investigation and commercialization of anti-inflammatory phytochemicals originated from Jeju traditional Citrus

II. Final goal of study

The final goal of this study is to help to extend market of Jeju traditional Citrus and develop resources for high-value products by identifying the bioactivity and its functional compounds and developing material for functional food.

III. Contents and range of study

- Standardization of Optimum extraction condition for phytochemicals using solvent supercritical extraction.
- Extracts profiling, purification and analysis of bioactive compound using GC-MS/MS, LC-MS/MS
- Elucidation of anti-inflammatory and/or cell variation reducing phytochemical from Jeju traditional Citrus using *in vitro* and *in vivo* systems.
- Study the action mechanism of phytochemicals from Jeju traditional Citrus on anti-inflammation and controlling cell variation.
 - Mechanism of apoptosis and NF- κ B signaling
 - Synergistic effects of commercial anti-inflammatory drug and phytochemical from Jeju traditional Citrus
- Develop the new products containing phytochemical from Jeju traditional Citrus
 - Selection of additives and formulation ratio and their product characterization

IV. Results

- Anti-proliferation and apoptotic activity and active material analysis of Jeju traditional Citrus (mature fruit) Extracts
 - Screening anti-proliferation and apoptotic activity of various mature citrus extracts and water extracts and 80% ethanol extracts show no apoptosis activity.
 - Prepare supercritical extracts of mature Iyegam, dangyuja, palsack and analyse supercritical extracts using GC/MS.
- Anti-proliferation and apoptotic activity and active material analysis of Jeju traditional Citrus (immature fruit) Extracts
 - Screening anti-proliferation and apoptotic activity of various immature citrus extracts and water extracts and 80% ethanol extracts show no apoptosis activity.
 - Prepare supercritical extracts of immature Iyegam, dangyuja, palsack and analyse

supercritical extracts using GC/MS.

- Measure cytotoxicity of extracts of Jeju traditional citrus on macrophage cells
 - Measure cytotoxicity of extracts of Jeju traditional citrus on macrophage cells and find inhibition of Nitric oxide generation of peel extract from traditional citrus.
- Screening the anti-oxidation activity of extracts from leaf of Guava
 - Obtain various guava leaf extracts and Screening the anti-oxidation activity of them
 - Conform the protective effects of various fraction from leaf of Guava against oxidative DNA damage.
- Screening and identification of anti-inflammation and anti cancer activity of capillaricin from capillaris
 - Evaluate anti-inflammatory activity of capillaricin *in vitro* assay and elucidate mechanism of apoptosis
- Evaluate anti-proliferation effects of essential oil from dangyuja peel against U373MG cells
 - Evaluate anti-proliferation effects of essential oil from dangyuja peel against U373MG cells and analyse essential oil from dangyuja peel using GC/MS.
- Screen dangyuja leaf extracts for the inhibitory activity of trans-differentiation of cancer cells and identify the phytochemical candidate of action.
 - conform dangyuja leaf extracts for the apoptosis activity against prostate cancer cell line and show nobiletin inhibitory activity on constitutive STAT3.
 - Show that apoptosis of SNU-16 stomach cancer cells induced by nobiletin is due to signaling via ER-stress.
- Anti-proliferative activity of supercritical extracts of yeagam peel (SEYG)
 - Measure the anti-proliferative activity of supercritical extracts of yeagam peel (SEYG) against various cancer cells and show SEYG inhibit constitutive STAT3. SEYG also anti-proliferative activity *in vivo* DU145 tumour mouse model.
 - Measure the anti-proliferative activity of osthole and auraptene from supercritical extracts of yeagam peel (SEYG) against stomach cancer cells and show osthole and auraptene induce apoptosis.
- Migration inhibitory effect of (supercritical extracts of phalsak peel (SEPS)) and mechanism
 - Measure the CXCR4 in SEPS treated cancer cells and show inhibited migration of cancer cells.
- Mechanism study of anti-inflammatory effects of optimum mixture of SEPS and danyuja (OM)
 - Anti-inflammation assay of OM *in vitro*
 - LPS induced NO was reduced by MO treatment in RAW264.7 macrophage cells
 - Anti-inflammation assay of OM *in vivo*
 - In animal model, measure protection effects of OM against LPS endotoxin and mouse death.

- Products development using phytochemical mixture
 - Select Guava and capillaris as final additive for anti-inflammatory biomaterial. Using response surface methodology, RSM, optimize the extraction condition.
 - Select best ratio of pasak, Guava and capillaris for anti-inflammation activity
 - Standardization of composition of mixture and produce tablet using extract mixture of Pasak and Guava
 - Standardization of composition of main source

V. Application of results

- Through development of high value biomaterial with known action mechanism, novel anti-inflammatory drug can be made
- Through development of high value biomaterial with known action mechanism, anti-cancer supplement or replacement can be made.
- By Developing the new techniques for making functional food and drug, change the simple raw material exporting system to high value functional food-exporting system.
- New resource development using traditional jeju citrus as new farm products.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction

Session 1. Purpose of study

Session 2. Necessity and contents of study

Chapter 2. The status of domestics and foreign technical development

Chapter 3. Contents and results of study

Chapter 4. Achievement and contribution on the related fields

Chapter 5. Plans for the application of the research

Chapter 6. Informations on scientific technology from overseas

Chapter 7. References

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	12
1절	연구개발의 필요성	12
1.1	기술적 측면	
1.2	경제 · 산업적 측면	
1.3	사회 · 문화적 측면	
2절	연구개발의 목표 및 범위	14
2.1	연구개발 목표	
2.2	연구개발 범위	
제 2 장	국내외 기술개발 현황	17
2.1	관련기술현황	
2.2	국내연구개발의 필요성	
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	20
1절	재래감귤 성숙과 추출물의 세포변이억제 효능 및 성분분석	20
1.1	주원료 선정을 위한 추출물의 암세포증식 억제 및 암세포사멸 효능 평가	
1.2	GC/MS를 통한 재래 감귤 초임계 추출물 성분 분석	
2절	재래감귤 미성숙과 추출물의 세포변이억제 효능 및 성분분석	46
2.1	주원료 선정을 위한 추출물의 암세포증식 억제 및 암세포사멸 효능 평가	
2.2	GC/MS를 통한 미성숙 재래감귤 초임계 추출물 성분 분석	
3절	재래감귤의 다양한 추출물에 대한 대식세포의 세포독성 측정	60
3.1	재래감귤의 다양한 추출물에 대한 대식세포의 세포독성 측정	
3.2	재래감귤의 과피 추출물에 대한 LPS로 유도된 산화질소 억제능 평가	
3.3	이예감 과피, 팔삭 과피 추출물의 항염증효능 평가	
4절	부재료로 사용된 구아바 잎 EtOAc 분획물과 인진쑥으로부터 분리된 Capillarisin의 생리활성기작 탐색	65
4.1	구아바 잎 EtOAc 분획물에 의한 HepG2 세포에서의 세포보호 효능 탐색	
4.2	인진쑥으로부터 분리된 Capillarisin의 항염증 효능 탐색 및 항암 기전 구명	
5절	당유자 과피 에센셜 오일에 의한 U373MG 세포에서의 세포 증식 억제 및 세포사멸	

효능 평가	79
1. 당유자 과피 에센셜 오일에 의한 U373MG 세포에서의 세포 증식 억제 효능 탐색	
2. 당유자 과피 에센셜 오일에 의한 U373MG 세포에서의 apoptosis 확인	
3. 당유자 과피 에센셜 오일 성분분석	
6절 당유자 잎 분획물의 세포변이억제효능 탐색 및 활성화에 기여하는 천연활성물질 (phytochemicals) 발굴	82
1. 당유자 잎에서 분리한 여러 가지 분획물에 대한 전립선 암세포 세포사멸기작 확인	
2. Nobiletin에 대한 constitutive STAT3 활성화도 저해능 평가	
7절 이예감 과피 초임계 추출물의 STAT3활성 저해 및 세포성장 억제	92
1. 이예감 과피 초임계 추출물에 의한 세포독성 및 세포변이 확인	
2. SEYG에 의한 암세포에서의 constitutive STAT3 활성도 저해능 평가	
3. DU145세포에서 SEYG에 의한 세포 증식 억제 평가	
4. DU145이종이식 마우스 모델을 이용한 생체내(<i>in vivo</i>)실험	
8절 팔삭 추출물의 항전이작용 및 기전 구명	102
1. 팔삭 과피 추출물에 의한 항전이 작용 확인	
2. 미성숙 초임계 팔삭 추출물에서의 생리활성 후보 물질들에 대한 세포사멸 효능 탐색	
9절 팔삭과피와 구아바의 최적혼합물로부터 항염증 활성 및 기전연구	110
1. 동물세포계(<i>in vitro</i>)를 이용한 OM의 항염증효능	
2. 동물 (<i>in vivo</i>)을 이용한 OM의 항염증효능	
10절 천연물 혼합제제를 이용한 제품 개발	115
1. 약용농산물 4종 (사철쭉, 구아바, 포공영, 황련) 중 항염증 효과가 우수한 부원료 선정	
2. 항염증 활성 증진을 위한 구아바 및 사철쭉 (인진호)의 추출조건의 최적화	
3. 항염증 활성 증진을 위한 재래감귤 팔삭 과피의 추출조건 최적화	
4. 항염증 활성이 우수한 기능성음료를 위한 재래감귤 팔삭 및 구아바, 인진호의 배합비 최적화	
5. 팔삭-구아바 혼합제제의 정제 타정용 시료 조제 및 구성약물의 품질표준화	
6. 주원료의 구성약물의 품질표준화	
7. 공정별 품질관리에 대한 항염증 활성 및 위생안전성	
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	176
1절 평가의 착안점 및 달성도	176
1. 1차년도 목표달성도	
2. 2차년도 목표달성도	
3. 3차년도 목표달성도	

2절	관련분야의 기여도	179
1.	기술적 측면	
2.	산업적 측면	
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	180
1절	실용화 · 산업화 계획	180
1.	결과물의 활용	
2.	산업체 이전 및 실용화	
3.	현장보급방안	
2절	추가연구개발	181
1.	논문투고 계획	
2.	추가기술개발	
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	182
1절	국내 제품생산 및 시장 현황	182
2절	국외 제품생산 및 시장 현황	182
3절	파이토케미컬 유래 향암소재 개발 현황	183
제 7 장	참고문헌	184

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 가. 자연계에 존재하고 있는 천연물, 식품 중에는 생리활성 효과와 치료효과를 나타내는 성분들이 많이 존재하여 이들을 대상으로 인체의 기능을 조절하는 생리활성물질에 대한 연구가 활발히 진행 중이며, 1994년 사이언지 논문에 따르면, 천연약용식물 중에서 암과 같은 인간의 수많은 질병을 예방하고 치료하는데 명백한 증거들이 있지만, 어떠한 성분이 이러한 효능을 가지고 있는 지, 어떠한 작용기전으로 효과를 지니고 있는지 아직 세세히 보고되어지지 않음.
- 나. 다수의 국내산 농산물이 향암, 항산화, 항염증 성분을 보유하고 있어 고부가가치산업으로의 발전 가능성이 매우 높은 것으로 보고되고 있으나, 아직은 초기단계의 단순가공 제품만을 생산하고 있어 산업화 가능한 지역특화작물의 발굴과 이를 이용한 신소재 개발에 대한 체계적인 연구가 시급함.
- 기능성 소재가 확인되고 일정수준의 기능성을 보유하였을 경우라도 이들이 기능성 식품으로 가공하는 전 과정에서 실제로 기능성이 유지되는가는 별도의 문제인 바, 이러한 모든 과정에 대한 종합적 연구결과의 필요성이 절실함.
- 다. 약용과일인 재래굴의 우수성과 차별화된 특성에 대한 과학적 근거가 필요함.
- 민속자료 및 동의보감에 의하면 제주도에만 자생하는 재래굴은, 다른 과실에는 찾아볼 수 없을 정도로 특이한 성분과 기능성 물질을 함유하고 있어서 심근수축력과 뇌 혈류량을 증가시키고 소염작용 그리고 피부알레르기 반응 억제, 항균 및 항산화 작용 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 이들 재래굴의 성분 분석 및 평가를 통한 기능성 연구가 아직 체계화되어 있지 않음 [1,2].
 - 재래굴 중 암과 같은 인간의 수많은 질병을 예방하고 치료하는데 명백한 사례들이 있지만, 어떠한 성분이 이러한 효능을 가지고 있는 지, 어떠한 작용기전으로 효과를 지니고 있는지 아직 세세히 보고되어지지 않아 이들을 대상으로 인체의 기능을 조절하는 생리활성물질에 대한 연구가 필요함.
- 라. 기능성 소재의 발굴과 특성 확인에 그치지 않고, 재래굴로부터 발굴된 기능성 소재를 이용하여 실제로 상용화 및 산업화를 완수함으로써, 가공품의 높은 부가가치를 창출하는 것이 절실히 요구됨.
- 재래굴은 생식용으로는 맛이 없고 품질이 떨어져 점차 새로운 품종으로 개량되어 지금은 몇 가지 재래종만을 찾아 볼 수 있으며(표 1), 이들 중 한방의 생약으로 이용되고 있는 진피(건조된 진굴의 껍질)와 당유자청(당절임당유자) 제조에 국한된 가공제품의 한계를 나타내고 있음.
 - 연구대상 재래굴의 부위별 유효활성 차이와 유효성분 추출 방법에 따른 차이 등에 대

한 심도 있는 연구가 병행되어야 하며, 이는 실용화에 필수적 과정임.

- 식품, 의약품 분야의 새로운 시장 창출을 위한 재래귤 신소재 개발을 위해 활성성분의 변화가 제일 적은 초임계 추출 기법 등을 이용한 추출법 개발이 필요함.

표1. 대표적인 재래귤

이름(학명)	형상	재배특성
<p>♣ 사두감 (<i>Citrus Sulcata</i>)</p> <p>과실모양은사자의 머리모양 과실크기는 종경 6-8cm, 횡경 5-7cm 일부 생리활성성분 보고됨</p>		내한성, 내병성
<p>♣ 빈귤 (<i>Citrus leiocarpa Hort. et Tanaka</i>)</p> <p>과실은 편구형 종경 2-3cm, 횡경 3-4cm</p>		내한성, 내병성
<p>♣ 진귤 (<i>Citrus Hort. ex Tanaks</i>)</p> <p>열매는 편구형 종경은 4.0cm 내외, 횡경이 3.5cm 내외 예부터 껍질은 말려서 약용으로 사용 다양한 약리활성(용도) 연구결과 보고됨</p>		내한성, 내병성, 창가병에 약함
<p>♣ 청귤 (<i>Citrus nippokoreana Tanaka</i>)</p> <p>과실은 편구형 종경 3-4cm, 횡경 4-5cm, 우리나라에서 일본으로 건너간 품종 세종실록지리지와 동의보감에 약효 기록됨</p>		내한성, 내병성
<p>♣ 당유자(唐柚子), (<i>Citrus grandis OSBEK</i>)</p> <p>과실은 계란형 종경 10-12cm, 횡경 9-10cm 동의보감에 (위속에 약기를 없애고 술독을 풀어준다는) 약효 기록</p>		내병성

마. 국내 유통 뿐 만 아니라 수출 등의 유통과정 상 제품안정성을 확보하기 위해 최종 혼합 조성물의 유효활성을 지속적으로 유지시킬 수 있는 기술이 확보되어야 하므로 이에 대한 연구는 필수적임.

- 유효물질의 활성을 최대화 시킬 수 있는 혼합조성물 개발연구가 제품개발 실용화에 중요한 핵심기술 중의 하나임

2. 경제·산업적 측면

- 가. 제주도내 전체가구의 19%, 제주도내 농가의 93%가 감귤농업에 종사하고 있어, 감귤산업은 도내 고용효과가 매우 큰 제주도의 기간산업이라고 할 수 있으나 최근 감귤경쟁력의 하락은 직접적인 제주경제 침체 원인으로 작용하고 있으며 감귤원 폐원 등의 고육지책을 모색하고 있으나, 근본적인 해결책을 모색해야 하는 상황.
- 나. 최근 감귤 주스 시장의 급성장에 따라 가공량이 증가하고 있으나 현재 감귤 가공회사에는 고부가가치 기능성 감귤 가공제품이 아닌 단순 가공 제품을 주로 생산하고 있어서 수익성이 미약함.
- 다. 시장의 개방화에 따라 경합 과일의 증가, 과일 소비성향, 품질 및 가격 경쟁력 약화 등에 따라 10년 후에도 지속 가능한 감귤산업을 기대하기 어려움. 따라서 감귤의 기능성 규명에 따른 기능성 식품 소재, 화장품 소재, 산업소재로의 활용가치 증대가 요구됨.
- 라. 최근 기능성성분을 함유한 건강식품의 수요가 날로 증가하고 건강을 위한 국내외적 관심 고조로 인해 향후 시장의 발전 가능성이 아주 높아있는 실정에서 약용과일인 당유자의 생리활성 성분을 이용한 가공식품개발로 농가소득증대 모색이 필요함.
- 마. 제주도는 미래성장동력산업으로 바이오산업을 선정하고 「제주생물산업발전10개년계획」을 수립한 바 있으며 제주감귤의 기능성규명 연구를 통한 소비확대 및 기능성 소재개발을 통해 감귤산업 부가가치를 2배 이상 창출하고자 함.

3. 사회·문화적 측면

- 가. 농축산물의 개방화, 글로벌화의 추세와 함께 중국 저가 농산물의 유입으로 제주 농축산물의 국제 경쟁력을 강화 할 필요성 대두하고 있으며 감귤원 폐원정책 추진에 따른 고소득 대체의 전략 작목으로서 제주의 특화된 품종 개발 및 발굴이 필요함.
- 나. 제주지역은 감귤 과다 생산에 의한 가격의 하락으로 감귤을 대체할 수 있는 새로운 대체작물을 찾아 감귤에 종사하고 있는 농민을 다른 작물로 전환시켜야 되는 절박한 실정이며, 근래 과실 소비성향이 기능성에 대한 인식이 높아지면서 재래감귤에 대한 수요가 증가하는 추세이므로 재래감귤 가공제품개발을 위한 기초적인 특성연구가 필요함.
- 다. 재래감귤은 한약재로 오래 전부터 사용되어온 약용과일로서, 기침, 감기, 천식, 기관지염, 간해독 등에 민간요법으로 오랫동안 상용되어 왔음에도 불구하고 이들 효능에 대한 체계적인 연구 미비한 형편임.
- 라. 따라서 소비자 기호에 맞는 기능성 감귤 가공식품 개발을 위해 재래감귤 기능성 성분에 대한 체계적인 특성과 생리활성에 대한 기작 규명이 필요함.

제 2절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구개발 목표

- 가. 제주에 자생하고 있는 재래귤(사두감, 당유자, 진귤 등)로부터, 기존의 소재보다 활성과 응용력이 큰 항염증 활성물질의 추출 및 생산 기술을 연구함으로써 참여회사가 실용화

시킬 수 있는 기술 개발

나. 재래굴 유래의 세포변이조절, 항염증 천연물소재 탐색 및 발굴

- 용매추출과 초임계 추출법에 의한 활성물질 프로파일링 및 추출 조건 최적화
- GC-MS/MS, LC-MS/MS를 이용한 재래굴의 수확시기 및 부위별 생리활성물질의 분석 및 분리정제 기술 개발

다. 재래굴 유래 추출물과 천연소재의 세포변이조절 및 항염증 효능 기전 규명

- 변이세포 사멸 기작 및 NF-kB의 활성 억제작용기전 규명
- 기존에 쓰이고 있는 항암제와 재래굴 유래 생리활성물질 혼합제제의 상승적 항암 작용기전 규명

라. 재래굴 유래 세포변이 조절 및 항염증 소재를 이용한 제품 개발

- 기능성 각테일음료 및 캡슐형 제품 개발
- 개발 제품의 표준 생산공정 확정

마. 제품의 안전성 확보 연구를 통한 최종 개발제품의 국내 및 글로벌 유통 실현

- 활성물질 안정성 확인 연구
- 위생안전성 연구

2. 연구개발 범위

가. 재래굴 활성물질 확보

- (1) 1단계 대상 재래굴(사두감, 당유자, 진굴 등) 수집 및 조추출물 확보
- (2) 완숙과 부위별 (과피, 과육, 통과 등)조추출물 확보 및 2단계 성숙시기별 대상 재래굴 선정
- (3) 2단계 성숙시기별 대상 재래굴의 부위별 (과피, 과육, 통과) 조추출물 확보
- (4) 확보된 시료로부터 열수추출물, 주정 추출물, 초임계 추출물 제조

나. GC-MS, LC-MS를 이용한 추출방법별 대사체 분석

- (1) 추출방법에 따른 생리활성성분의 상관관계 규명
- (2) 농산물과 재래굴 metabolome의 profiling/fingerprinting 분석 및 항염증 활성과의 상관관계 규명

다. 암세포(KBM-5, MCF-7, and H1299)에서 추출물이 TNF에 의해 유도되는 NF-kB활성 저해 평가

- (1) EMSA (electrophoretic mobility shift assay)
- (2) NF-kB reporter gene assay
- (3) Western blot: IκB-alpha, phospho-IκB-alpha, p65, phospho-p65

라. TNF에 의해 유도되는 NF-kB upstream kinase활성 저해 평가

- (1) Kinase assay - IKK assay
- (2) MAPK assay - p38, ERK, JNK

마. NF-kB에 의해 조절되는 여러 단백질 조절 연구

- (1) Antiapoptotic proteins: Bcl-2, Bcl-xl, survivin, IAP1, IAP2, and COX-2
- (2) Cell proliferating protein: cyclin D1
- (3) Metastatic proteins: MMP-9, ICAM
- (4) Angiogenetic protein: VEGF

- (5) Caspase-3, caspase-8, caspase-9, PARP
- 바. 암세포(HeLa, SNU-1, HepG2, SNU-16, MCF-7) 및 암줄기세포(cancer stem cell)에 대한 세포사멸 (Apoptosis) 기전 분석
 - (1) Annexin V staining 후 FACS analysis
 - (2) Hoechst 염색 및 형광현미경 관찰
 - (3) FACS 분석에 의한 Cell cycle analysis (PI staining)
 - (4) RT-PCR과 Western blot 에 의한 antiapoptosis 혹은 proapoptosis 관련 유전자 및 단백질 발현 양 분석
- 사. 암세포(U266, and MDA-MB-231)에서 천연활성물질이 IL-6-induced STAT3와 Constitutive STAT3활성 저해 평가
 - (1) EMSA (electrophoretic mobility shift assay)
 - (2) JAK2 kinase assay
 - (3) Western blot: phospho-Src, phospho-JAK1, phospho-JAK2
 - (4) Immunocytochemistry for (STAT3)
 - (5) STAT3-luciferase assay
- 아. 기존 항암제와 천연활성물질에 대한 상승적인 암세포사멸 평가
 - (1) 세포독성 측정 (MTT assay, XTT assay, Trypan blue exclusion)
 - (2) 약물을 처리한 후에 세포의 형태 관찰 (Microscope)
 - (3) 기존항암제와 병행처리시 apoptosis 상승효과 검증
- 자. 동물 모델을 이용한 신규 후보 물질의 항암 및 항전이 활성 규명
 - (1) 암이 유발된 동물 모델에 활성물질 투여하여 Tumor 사이즈 측정
 - (2) 암조직내에서 NF-kB와 STAT3 발현 여부관찰
 - (3) 암조직내에서 특정 단백질 (survivin, Bcl-2) 발현 여부관찰
- 차. 제품화를 위한 대량 추출물의 제조조건 확립 및 시제품 제조
 - (1) 최종 선발된 고활성 물질을 이용한 혼합제재 구성
 - (2) 혼합제재별 항염증활성 확인 및 최적혼합제재 선정
 - (3) 부원료 선정 및 적정 원료배합비율
 - (4) 최적혼합제재를 이용한 액상 및 고상 제품개발 및 제조공정 표준화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 관련기술현황

- 가. 주요국의 기술 개발 동향은 표와 같으며 별첨 자료에 나타난 바와 같이 국외에 비해 국내의 관련 기술 개발 현황은 매우 저조함.
- 나. 감귤류의 기능성 관련된 국내 특허 동향은 아래 표와 같으며 전반적으로 심혈관 질환의 예방 및 치료를 위한 효능 분야에 관련된 연구가 주를 이루고 있다.

자료: '2002년도 난지권 청정 농업과학기술 개발을 위한 중장기연구개발계획', 농촌진흥청 제주농업시험장

특허명	활성성분	효능
비타민씨와 감귤추출 농축액을 활성성분으로서 포함하는 3-하이드록시-3-메틸글루타릴코에이 환원효소 활성 저해제 조성물	비타민씨, 헤스페리딘, 나린진	고지혈증 예방
감귤류 과피 추출물, 이로부터 분리 정제된 헤스페리딘 또는 나린진을 포함하는 심혈관 질환 예방 및 치료제 조성물	헤스페리딘, 나린진	심혈관 질환 예방
나린진 또는 나린제닌을 포함하는 아실 코에이:콜레스테롤-오-아실 트랜스퍼레이즈 저해제 조성물	나린진, 나린제닌	심혈관계 질환의 예방 및 치료
네오헤스페리딘하이드로퀴논을 포함하는 동맥경화증, 고지혈증, 간질환, 고혈당증의 예방 및 치료용 조성물	네오헤스페리딘, 다하이드로퀴논	동맥경화증, 고지혈증, 간질환, 고혈당증의 예방 및 치료
감귤류과피 추출액을 포함하는 아실코에이:콜레스테롤-오르토-아실 트랜스퍼레이즈 저해제 조성물		심혈관계 질환의 예방 및 치료제
대추 추출물 및 감귤류 과피 추출물을 포함하는 지질대사개선 및 혈압강하용 조성물		간 질환, 고혈압증, 동맥경화증, 고지혈증 및 암 예방
나린진 또는 나린제닌을 포함하는 혈소판 응집 억제용 조성물	나린진, 나린제닌	혈소판 응집 억제
인삼 및 감귤류 과피 유래 물질을 포함하는 건강증진용 식품조성물	감귤류 과피 유래의 플라보노이드	동맥경화증, 고지혈증, 중풍, 당뇨, 암, 간질환 등 예방 및 뇌혈관 강화
헤스페리딘을 포함하는 하이드록시메틸글루타릴-코에이 환원효소 활성 저해용 조성물	헤스페리딘, 나린진	심혈관 질환의 예방 및 치료

- 다. 재래감귤에 대한 연구는 은주밀감의 성분 및 약리활성에 관한 연구에 비해 상대적으로 매우 미비함.
- 1980년 한국생약학회지에 게재된 “당유자의 성분 연구”에서 플라보노이드계 3성분과 에스테르계 1성분만이 보고되었으며, 재래감귤의 각 부위별 추출물에 대한 생리활성 물질 연구는 아직 미진한 상태임.
 - 1998년 한국식품과학회지에 “제주산 감귤류의 숙기에 따른 유리당, 유기산, 헤스페리딘, 나린진, 무기물 함량의 변화”에서 미성숙과는 제외되고 성숙시기에 해당하는 시기를 여러 단계로 구분한 후 일부 재래품종과 도입된 장려품종에 대한 성분 분석이 단편적으로 보고된 바가 있음 [3].
 - 2002년 한국식품과학회지에 “제주재래종 감귤류 미숙과의 neohesperidin, naringin 및 hesperidin 함량”에서 생리낙과가 종료된 8월 초순부터 20일 간격으로 5차례에 걸쳐 채취된 시료에 대한 연구결과, 수확을 시작한 초기에 각 플라보노이드 함량의 급격한 일어남을 보고했으며 [4] 따라서 보다 이른 시기의 미숙과에 대한 검토와 다양한 생리활

성 물질 분석이 필요함.

- 라. 최근에 국제적으로 가장 큰 관심분야로 주목받고 있는 anti-inflammation(항염증) 기능성에 대한 연구로, inflammation(염증)은 세포변이에 의한 암유발을 비롯하여 천식, 당뇨병, 알츠하이머, 죽상동맥경화증, 신생혈관형성, 골다공증 등 매우 다양한 질병과 관련이 있는 것으로 최신 국제학술지에 속속 보고되고 있음 [5].
- 마. 현재까지 보고된 바에 의하면 anti-inflammation(항염증)은 주매개체인 TNF(tumor necrosis factor)와 전사인자 NF- κ B(nuclear factor- κ B)를 저해 또는 억제하는 것이 핵심기술로 [6], 최근에 선진 세계 각국은 이에 대한 연구 및 국가적 관심이 가히 폭발적인 상황에 이르고 있는 실정이며, 본 기술의 다양한 제품적용 가능성 등 경제성과 그 파급효과는 상상을 초월할 것으로 예상됨.
- 바. 특히, 천연물 유래의 anti-inflammation활성물질에 대한 연구는 응용분야가 방대하여 기능성 식품 및 의학계의 최대 관심사로 부각되고 있으며, 관련 기술선점은 국가적 차원에서 매우 중요한 기술임.
- 사. Apoptosis는 정해진 일련의 신호전달과정을 통하여 세포 스스로 죽는 programmed cell death의 한 종류이며, 세포의 원형질막의 blebbing현상, 세포부피의 감소, 핵의 응축, DNA의 절단, 미토콘드리아의 density 감소, apoptotic body형성 등이 대표적인 특징인 세포의 죽음임.
- 아. 다양한 종류의 세포죽음 경로가 손상된 것이 암의 특징으로 밝혀짐에 따라 최근의 항암 연구 동향은 이러한 다양한 경로의 세포죽음의 활성화를 회복하는 것이 항암 전략이 중요한 타겟이 되고 있으며, BH3 mimetics [7], Trail [8], IAP 저해제와 Smac mimetics [9], Choroquine [10]처럼 특정 세포사멸경로를 타겟으로 한 암치료 물질에 대해 밝은 전망을 나타내고 있음.
- 자. 우수한 생리활성을 갖는 식품 소재의 발굴을 위해서는 재래굴의 종류별, 시기별, 부위별 metabolite의 차이 규명이 매우 중요하며 이와 관련하여 생리활성 성분 분석기술 개발이 필요하며, 다양한 *in vitro* 효능 시험과 더불어 *in vivo* 시스템을 이용한 지속적 연구가 필요함.
- 차. 재래굴의 기능성 발굴과 특성 확인에 그치지 않고, 발굴된 기능성 소재를 이용하여 실제로 상용화 및 산업화를 완수하기 위해, 혼합조성물 개발연구와 최종 혼합조성물의 유효활성을 지속적으로 유지시킬 수 있는 기술 개발이 필요함.

2. 국내연구개발의 필요성

- 가. 제주도내 전체가구의 19%, 제주도내 농가의 93%가 감귤농업에 종사하고 있어, 감귤산업은 도내 고용효과가 매우 큰 제주도의 기간산업이라고 할 수 있으나, 시장의 개방화에 따라 경합 과일의 증가, 과일 소비성향, 품질 및 가격 경쟁력 약화 등으로 인해 새로운 대체작물을 찾아 감귤에 종사하고 있는 농민을 다른 작물로 전환시켜야 되는 절박한 실정임.
- 나. 2001년 제주도 감귤 총 생산량의 7%가 가공되었고, 2002년에는 17%정도가 가공 처리되었으나 가공회사에는 고부가가치 기능성 감귤 가공제품이 아닌 단순 가공 제품을 주로 생산하고 있어서 수익성이 미약함.

- 다. 기능성 식품시장 규모는 2007년 세계적으로 1,500억불이고 국내는 3조 4천억 원으로 추산되며 최근 기능성성분을 함유한 건강식품의 수요가 날로 증가하고 있는 실정에서 약용과일인 재래굴의 생리활성 성분을 이용한 가공식품개발로 농가소득증대 모색이 필요함.
- 라. 근래 과일 소비성향이 기능성에 대한 인식이 높아지면서 재래굴에 대한 수요가 증가하는 추세임. 따라서 재래굴 가공제품개발을 위한 기초적인 특성연구가 필요함.
- 마. 농축산물의 개방화, 글로벌화의 추세와 함께 중국 저가 농산물의 유입으로 제주 농축산물의 국제 경쟁력 강화가 필요하며, 감귤원 계원정책 추진에 따른 고소득 대체의 전략 작목으로서 제주의 특화된 품종 개발 및 발굴이 필요.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 재래감귤 성숙과 추출물의 세포변이억제 효능 및 성분분석

1. 주원료 선정을 위한 추출물의 암세포증식 억제 및 암세포사멸 효능 평가

가. 암세포에서의 재래감귤의 열수, 80% 에탄올 추출물들에 대한 세포증식 억제 효과 탐색

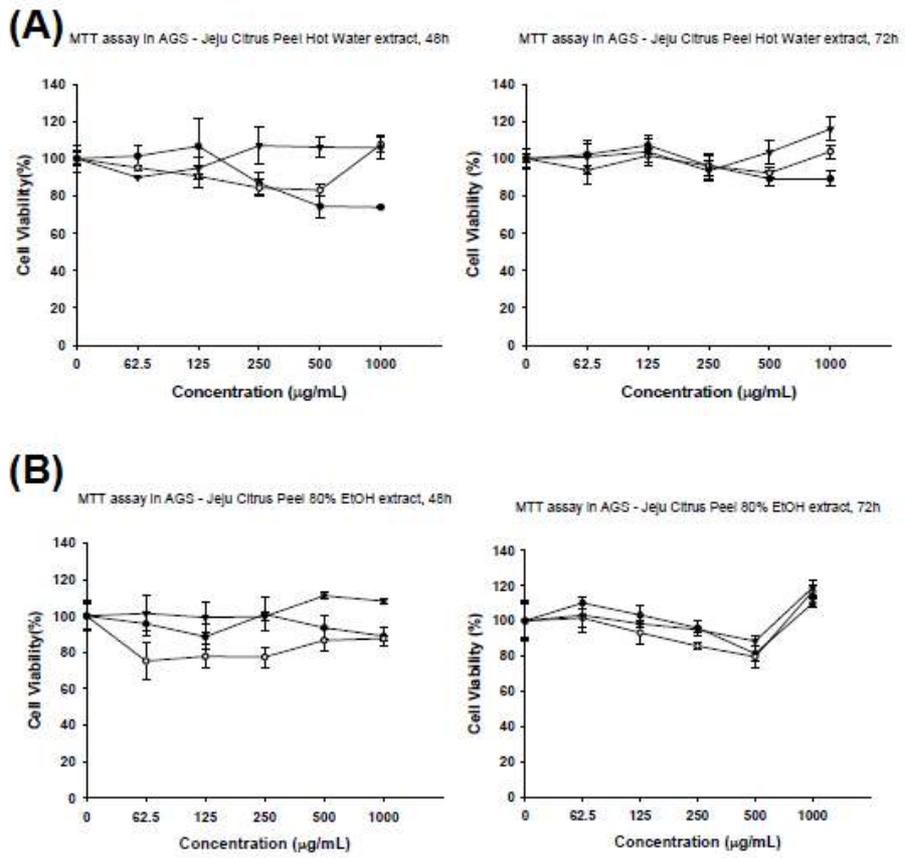
- 당초계획에는 당유자, 사두감, 진귤을 대상으로 실험을 계획하였으나 물량확보의 어려움이 발생한 사두감, 진귤 대신 이에감과 팔삭을 포함하여 2011년 1월 참여기업인 (e)제주 영농조합으로부터 당유자, 이에감, 팔삭 성숙과일을 확보한 후 농약 및 기타 불순물의 제거를 위해 수확 즉시 물로 2회 세척하였다. 과육과 과피를 분리하고 -70 °C deep freezer에서 3일간 동결한 후, 72시간 동결건조 하였다. 열수 추출의 경우, 동결건조 시킨 제주 재래감귤 과피, 과육, 통과를 각각 마쇄 시킨 뒤, 1:30 으로 DW에 넣어준 후 1시간동안 105 °C 1.2기압에서 추출하였다. 필터한 후 농축시키고 동결 건조하여 상온 암조건에서 보관하고 DMSO에 녹여 사용하였다. 80% EtOH 추출의 경우, 동결건조 시킨 제주 재래감귤의 과피, 과육, 통과를 각각 마쇄 시킨 뒤, 각각을 80% ethanol에서 시료대 용매의 비율을 1:30으로 하여 45분 간 초음파 처리하여 얻은 추출물을 농축시키고 동결 건조한 후, DMSO에 녹여 실험에 사용하였다. 실험실에서 제조한 에탄올, 열수추출물의 수율은 아래 table 1과 같다.

Table 1. Yield of Hot water and 80% ethanol extract.

Sample		열수 추출물 추출량 (g)	수율 (%)	80% 에탄올 추출물 추출량 (g)	수율 (%)
당유자	과육	4.33	43.3	7.40	74
	과피	2.89	28.9	4.94	49.4
	통과	3.55	35.5	6.07	60.7
이에감	과육	4.21	42.1	7.98	79.8
	과피	2.81	28.1	5.33	53.3
	통과	3.45	34.5	6.55	65.5
팔삭	과육	8.74	87.4	6.50	65
	과피	5.83	58.3	4.34	43.4
	통과	7.16	71.6	5.33	53.3

- MTT-assay를 통하여 human gastric cancer cell인 AGS와 human cervical cancer cell인 HeLa cell, 그리고 normal cell인 human lung fibroblast에 대해서 제주 재래감귤 추출물의 항암 효능을 측정된 결과, 24, 48, 72시간 처리 시 열수 추출물과 80% 에탄올추출물에서 항암활성이 높게 나타나지 않았다 (Fig. 1 A-D). 또한 제주 재래감귤 추출물의 일반세포에 대한 영향을 확인하기 위하여 정상 세포주인 fibroblast에 MTT-assay를 수행한 결과, 48 시간 처리 시 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 1E). 이를 통해 열수추

출물과 80% 에탄올추출 방법에 의한 제주 재래감귤 추출물은 암세포에 대한 항암효능이 크게 나타나지 않는다는 것을 알 수 있었다.



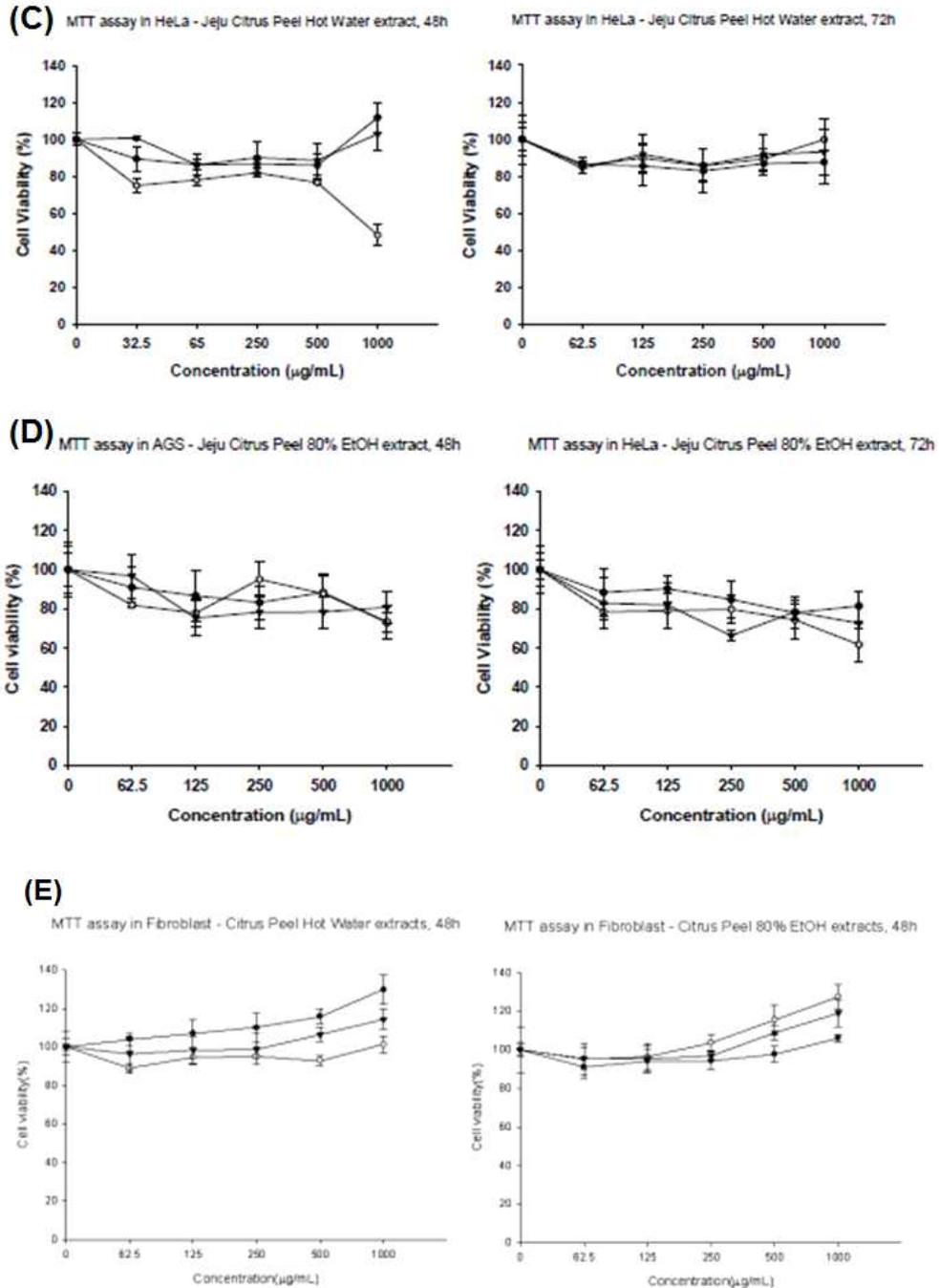


Figure. 1. Jeju traditional citrus peel extract inhibits the cell proliferation on AGS and HeLa cell lines. (A) Hot water extract was treated on AGS in 24 h, 48 h and 72 h. (B) 80% ethanol extract was treated on AGS in 24 h, 48 h and 72 h. (C) Hot water extract was treated on HeLa in 24 h, 48 h and 72 h. (D) 80% ethanol extract was treated on AGS in 24 h, 48 h and 72 h. (E) Hot water extract (left) and 80% ethanol extract (right) were treated on fibroblast in 48 h, respectively. (●: 당유자, ○: 팔삭, ▼: 이예감).

나. 암세포에서의 재래감귤 초임계 추출물들의 세포증식 억제 효과 탐색

(1) 초임계 추출물의 확보 및 위암세포주와 자궁암세포주에 대한 세포 생존율 및 세포형태 변화 확인.

- 동결건조 시킨 제주 재래감귤의 과피, 과육, 통과를 각각 마쇄시킨 뒤, 그린텍이십일(주)에 의뢰하여 초임계 추출물을 제조하였다. 초임계 추출조건은 2시간 동안 1 L Extractor로 300 bar, 50 °C에서 추출하였으며 이에감 과육의 경우 1시간 30분 동안 추출하였다. 경희대와 제주대의 생리활성 실험을 위해 동일한 초임계 추출물 분주한 후 상온에서 암 조건에 보관하면서 DMSO에 녹여 사용하였다. 각 부위에 따른 초임계 추출물 수율은 table 2와 같다.

Table 2. Yield of CO₂ supercritical extract.

샘플명	시료량	추출시간	추출량	추출수율(%)	
당유자	Flesh	332.65	2 h	5.05	1.52
	Peel	220.24	2 h	2.88	1.31
	Whole	280.14	2 h	5.27	1.88
이에감	Flesh	279.66	1 h 30 min	3.9	1.40
	Peel	300.56	2 h	4.04	1.34
	Whole	330.98	2 h	3.69	1.11
팔삭	Flesh	371.06	2 h	1.75	0.47
	Peel	280.38	2 h	2.24	0.84
	Whole	319.24	2 h	2.68	0.79

- MTT-assay를 통하여 human gastric cancer cell인 AGS와 human cervical cancer cell인 HeLa cell에 대해서 제주 재래감귤 초임계 추출물의 항암 효능을 측정한 결과 48시간 처리 시 과육 (A), 과피 (B)에서 모두 팔삭 추출물이 세포의 성장억제에 가장 효능이 좋은 것으로 나타났다. 통과에서는 큰 효능이 없어, 효능이 좋은 과육 (A)와 과피 (B) 위주의 실험을 하였으며, 과육 (A)보다는 과피 (B)에서가 세포 성장억제 효과가 좋은 것을 알 수 있었다. Cell line 별로 비교를 해 보았을 때, AGS보다는 HeLa에서 과피의 효능이 세포 특이적으로 효능을 보인다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

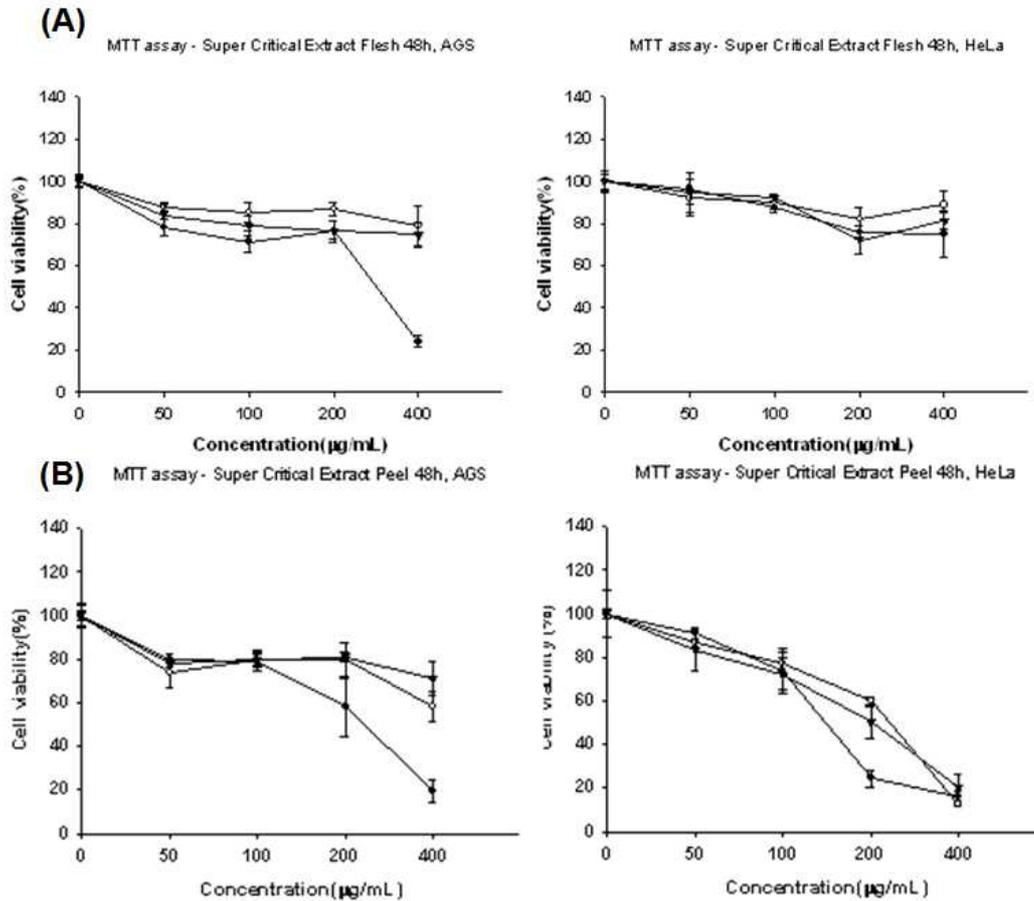
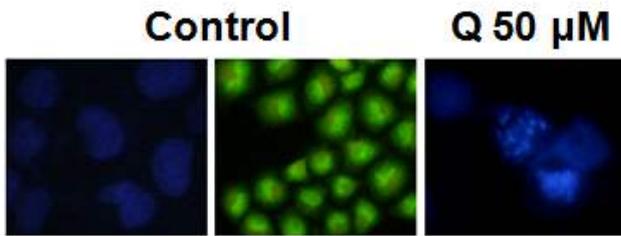


Figure. 2. Jeju traditional citrus super critical extract inhibits the cell proliferation on AGS(left) and HeLa(right) cell lines. (A) Citrus peel super critical extract was treated 48 h on AGS(left) and HeLa(right), respectively. (B) Citrus flesh super critical extract was treated 48 h on AGS(left) and HeLa(right), respectively (●: 팥삭, ○: 당유자, ▼: 이예감).

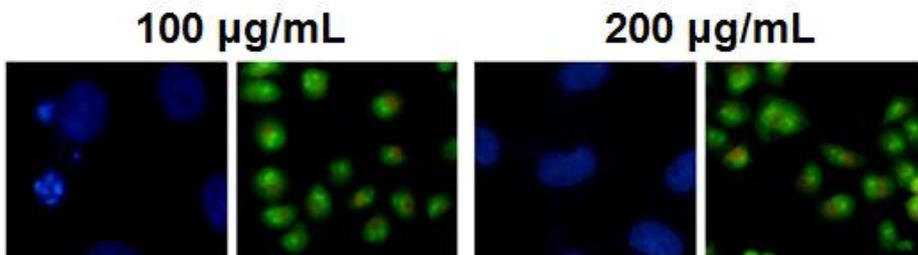
- 위암세포주인 AGS와 자궁암세포주인 HeLa 세포에서 과피 초임계 추출물에 의해 세포 생존율이 더 낮게 나타나고 있음을 토대로 재래감귤 과피 초임계 추출물에 의한 세포 사멸기작 연구를 위해 추가적인 실험을 진행하였다. 60 mm cell culture dish에 3×10^4 cell/mL 농도로 세포를 분주하여 하루 배양한 뒤, 추출물을 처리하고 24시간 더 배양하였다. 24시간 후 10 µM의 Hoechst33342 또는 acridine orange dye를 넣고 37 °C에서 10분간 염색시킨 뒤 형광현미경을 이용하여 세포를 관찰하였다. Hoechst33342 & Acridine Orange staining 으로 농도는 100, 200 µg/mL로 하여 세포 모양을 현미경으로 관찰 하였을 때, 팥삭 추출물 Hoechst33342 staining에서는 apoptotic body 형성이 되었고, Acridine Orange staining에서도 주황색 염색이 되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3B).
- 당유자 추출물 Hoechst33342 staining에서는 apoptotic body 형성이 관찰되지 않는 반면에 Acridine Orange staining에서는 autophagic morphology change라 생각되는 주황색 dot이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3C). 이예감 추출물에서는 Hoechst33342 staining에서 apoptotic body가 형성되지 않았으며, Acridine Orange staining에서는 autophagic morphology change라 생각되는 주황색 dot이 증가하는 것

을 확인할 수 있었다 (Fig. 3D).

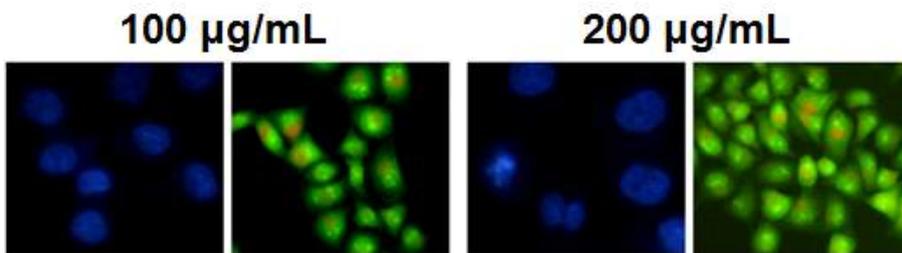
A Control



B 팔삭 과피



C 당유자 과피



D 이예감 과피

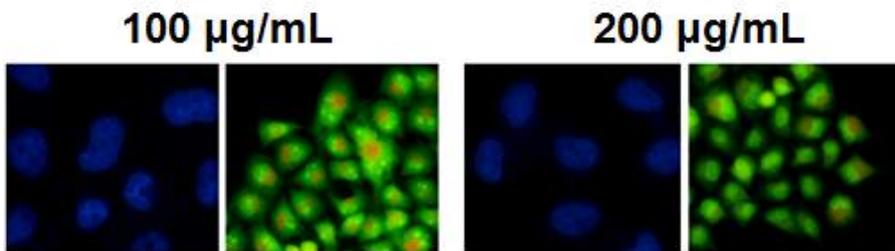
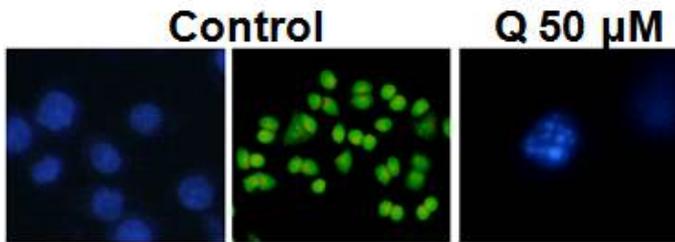


Figure. 3. Effect of Jeju traditional citrus super critical extract on cell morphology.

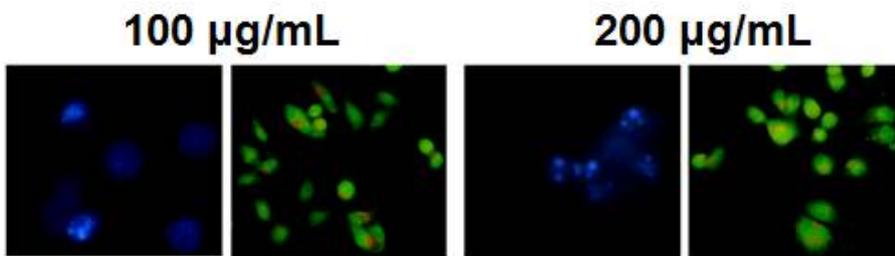
- 위와 같은 방법으로 위암세포주인 AGS에도 Hoechst33342 staining과 acridin orange staining을 수행하였다. Hoechst33342 & Acridine Orange staining 으로 농도는 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하여 세포 모양을 현미경으로 관찰 하였을 때, 팔삭 추출물 Hoechst33342 staining에서는 apoptotic body 형성이 되었고, Acridine Orange staining 에서도 주황색 염색이 되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 4B). 당유자 추출물

Hoechst33342 staining에서는 농도 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 apoptotic body 형성이 관찰되었고, 반면에 Acridine Orange staining에서는 autophagic morphology change라 생각되는 주황색 dot이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4C). 이에감 추출물에서는 Hoechst33342 staining에서 apoptotic body가 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 보이기 시작했으며, Acridine Orange staining에서는 autophagic morphology change라 생각되는 주황색 dot이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4D).

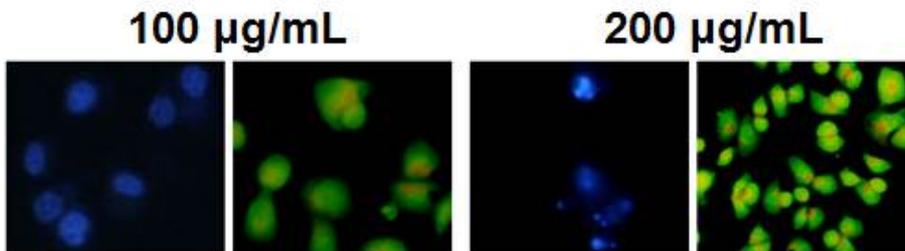
A Control



B 팔삭 과피



C 당유자 과피



D 이에감 과피

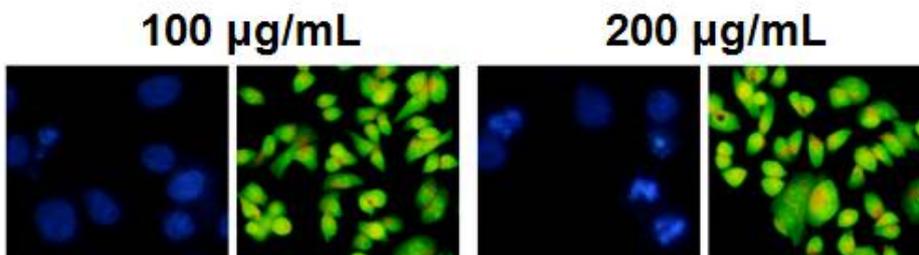


Figure. 4. Effect of Jeju traditional citrus super critical extract on cell morphology.

- MTT assay 결과에서 가장 좋은 효과를 나타내었던 팔삭 추출물을 처리한 AGS와 HeLa세포를 FACS analysis로 cell cycle 을 확인한 결과 다른 추출물 보다 높은

Sub-G1기의 증가를 확인할 수 있었다 (Table 3, 4). 이를 통하여 팔삭은 다른 제주 재래감귤과는 다르게 apoptosis를 통하여 cell의 죽음을 유도하는 것으로 생각되어진다.

Table 3. FACS analysis of Sub G1 phase (%) in the HeLa cells treated with extract.

HeLa		당유자		이예감		팔삭	
µg/mL	Control	50	100	50	100	50	100
Sub-G1	8.81	7.76	15.47	7.32	14.29	36.17	47.31
G1	55.64	45.40	37.78	51.19	48.77	31.38	23.61
S	14.94	16.03	18.43	15.20	14.21	11.35	13.10
G2/M	20.83	31.14	28.80	26.71	23.04	21.46	16.32

Table 4. FACS analysis of Sub G1 phase (%) in the AGS cells treated with extract.

AGS		당유자		이예감		팔삭	
µg/mL	Control	50	100	50	100	50	100
Sub-G1	4.59	6.19	10.49	5.14	7.07	9.53	30.58
G1	52.38	50.50	47.78	54.96	53.42	51.32	41.85
S	16.79	15.95	15.46	16.26	16.19	13.43	11.44
G2/M	26.48	27.70	26.52	23.89	23.88	25.94	16.44

(2) 당유자 과피 초임계 추출물에 의한 자궁암세포주인 HeLa에서의 apoptosis 관찰.

- MTT-assay를 통하여 human cervical adenocarcinoma cell인 HeLa 세포에 성숙 당유자 초임계 추출물 (과육, 과피)을 농도별로 처리하여 항암 효능을 측정된 결과, 48시간 추출물 처리시 세포 증식 억제 효과는 농도 의존적으로 나타났으며 과피 추출물이 더 효과적으로 나타났다 (Fig. 5). 따라서 이후의 실험은 성숙 당유자 과피 초임계 추출물을 사용하여 수행하였다.

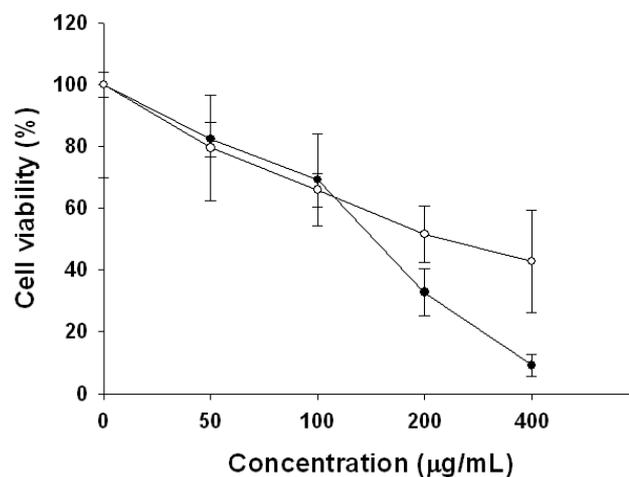


Figure 5. Jeju traditional mature Danguyuja super critical extract inhibits the cell proliferation on HeLa cell line (●: peel, ○: flesh).

- 이후 당유자 과피 초임계 추출물의 농도를 다양하게 하여 추출물에 의한 세포의 형태 변화 및 apoptotic body 형성유무를 확인하기 위하여 hoechst33342 staining을 수행하였다. 성숙 당유자 과피 초임계 추출물 농도는 0, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하여 24시간 후에 세포 모양을 형광현미경으로 관찰 하였다. 그 결과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서부터 apoptotic body가 형성됨을 확인 할 수 있었다 (Fig. 6).

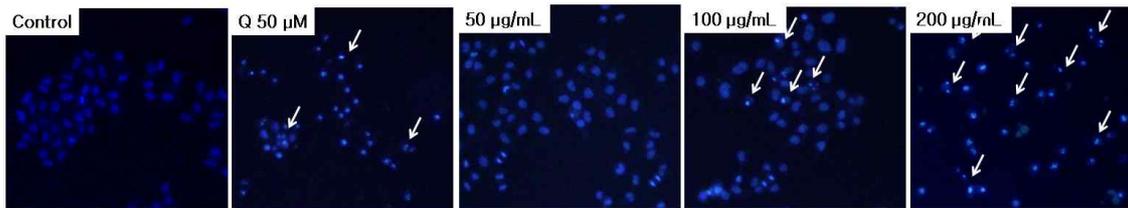


Figure. 6. Effect of Jeju traditional mature Dangyuja peel super critical extract on cell morphology (Q50: Quercetin 50 μM).

- 성숙 당유자 과피 초임계 추출물에 의한 apoptosis현상과 세포주기의 연관성을 확인하기 위해 세포주기를 확인하였다. 60 mm cell culture dish에 3×10^4 cell/mL농도로 세포를 분주하여 하루 배양한 뒤, 추출물을 처리하고 24시간 더 배양하였다. 24시간 후 세포를 원심분리를 통해 모은 뒤, 70% cold ethanol로 고정한 뒤, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide 로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 세포를 염색하여 cell cycle을 측정하였다. (Table 5). 성숙 당유자 과피 추출물을 FACS analysis로 cell cycle을 확인한 결과 농도 의존적으로 sub-G1기의 증가를 확인할 수 있었다. 이를 통하여 성숙 당유자 과피 초임계 추출물은 apoptosis를 통하여 세포의 죽음을 유도하는 것으로 생각되어진다.

Table 5. Analysis of % of Sub G1 phase in the HeLa cells treated with peel extract.

$\mu\text{g}/\text{mL}$	Control	50	100	200	Quercetin 50 μM
Sub-G1	2.00	5.87	39.49	86.97	5.32
G1	60.28	60.22	27.59	10.25	61.45
S	13.18	13.04	11.90	2.10	11.68
G2/M	24.82	21.31	21.56	0.89	21.99

- 당유자 성숙 과피에 의한 apoptosis를 다른 방법으로 확인하기 위하여 DNA fragmentation을 확인하였다. 100 mm cell culture dish에 5×10^4 cell/mL로 HeLa 세포를 넣고 하루 배양한 뒤, 당유자 성숙 과피 초임계 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포를 원심분리를 통해 모은 뒤 lysis buffer와 protease K를 넣고 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 over-night으로 반응 시켰다. 이 후, phenol-chloroform methods를 통하여 DNA를 분리한 뒤 1.8% agarose gel에 전기영동하여 결과를 확인 하였다. 그 결과 농도 의존적으로 DNA의 fragmentation 현상을 확인 할 수 있었다 (Fig. 17).

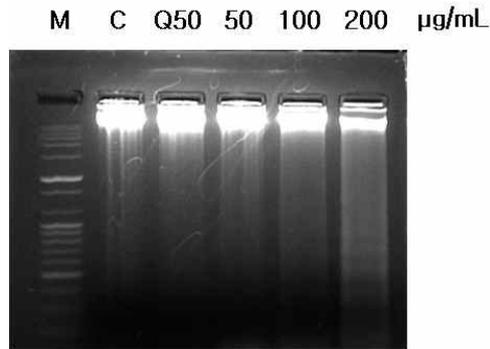


Figure. 7. DNA fragmentation of HeLa cells induced by Jeju traditional mature Dangyuja peel super critical extract (Q50: Quercetin 50 μ M).

- HeLa 세포에 성숙 당유자 과피 초임계 추출물을 24시간 처리한 후 세포를 lysis하여 단백질을 추출한 뒤 SDS-PAGE 전기영동을 통해 단백질을 크기별로 나눈 뒤 transfer를 통해 PVDF membrane에 단백질을 부착시킨 뒤 항원 항체 반응을 통해 apoptosis 관련 단백질들을 확인한 결과 PARP의 cleavage와 caspase-9, caspase-3의 활성화를 관찰할 수 있었다 (Fig. 8).

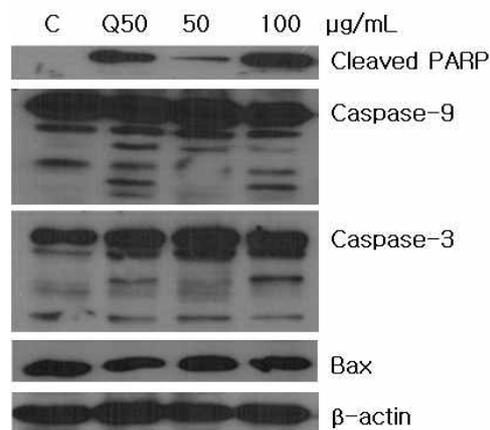


Figure. 8. Western blot analysis of apoptosis-related protein expression in mature Dangyuja peel super critical extract-treated HeLa cells (Q50: Quercetin 50 μ M).

(3) 유방암 줄기세포를 이용한 팔삭 초임계 추출물의 항암효능

- 유방암 줄기세포를 96well plate에 5×10^4 cell/mL로 분주하여 하루 배양한 뒤 추출물을 농도별로 처리하고 일정시간 배양한 뒤 5 mg/mL의 MTT solution을 4시간동안 처리하였다. 이후 배지를 제거하고 formazan crystal을 DMSO에 녹인 뒤 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험결과, 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하고 있음을 확인하였다. 세포 생존율이 감소하는 것을 통하여 팔삭 초임계 추출물이 암세포를 사멸시킬 수 있는 것으로 판단할 수 있다 (Fig. 9).

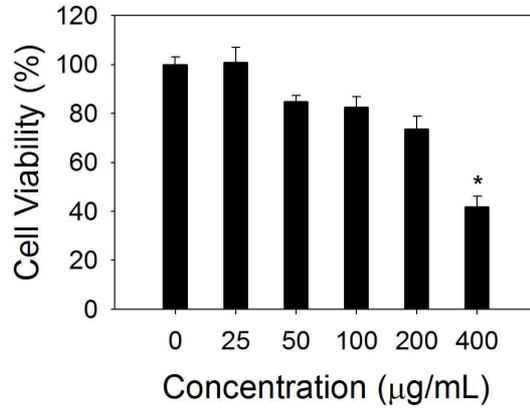


Figure. 9. Supercritical CO₂ extract from palsak induces cell death in breast cancer stem cells.

- MTT Assay를 통하여 확인된 팔삭 초임계 추출물에 의한 세포죽음의 기작을 확인하기 위하여 세포내 단백질 발현정도를 확인할 수 있는 immunoblot을 수행하였다. 유방암 줄기세포에 팔삭 초임계를 농도별로 처리한 뒤 24시간 후에 세포내 apoptosis관련 단백질들의 발현 변화를 western blot analysis를 통하여 확인하였다. 그 결과, 팔삭 초임계 추출물에 의해 PARP의 cleavage, procaspase-9과 3의 활성화, anti-apoptosis protein인 Bcl-2의 발현 감소와 pro-apoptosis protein인 Bax의 발현 증가를 통하여 팔삭 초임계 추출물에 의해 사멸하는 유방암 줄기세포가 apoptosis를 통하여 사멸하고 있음을 확인하였다 (Fig. 10).

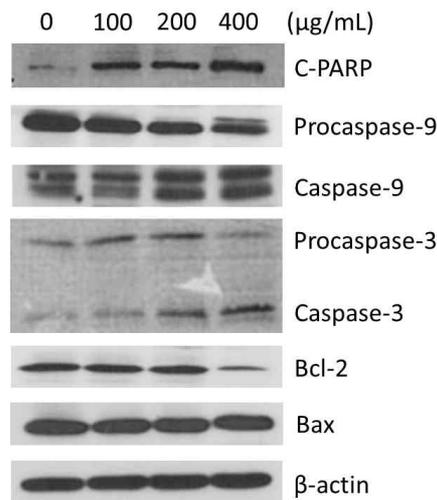


Figure. 10. Supercritical CO₂ extract from palsak induces apoptotic cell death in breast cancer stem cells.

- 팔삭 초임계 추출물에 의해 억제내성을 유도하는 유전자로 알려진 ABCG2의 발현 변화를 확인하기 위하여 reverse transcripaional PCR을 통하여 ABCG2의 발현 정도를 확인하였다. 세포에서 trizol solution을 이용하여 RNA를 추출한 뒤, cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 ABCG2 primer와 PCR을 이용하여 세포 내에서 발현정도를 확인

하였다. 그 결과 농도 의존적으로 ABCG2의 발현이 감소하고 있었으며 (Fig. 11A), house keeping 유전자인 GAPDH의 발현정도와 비교하였을 때에도 농도 의존적으로 발현이 감소하고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 11B).

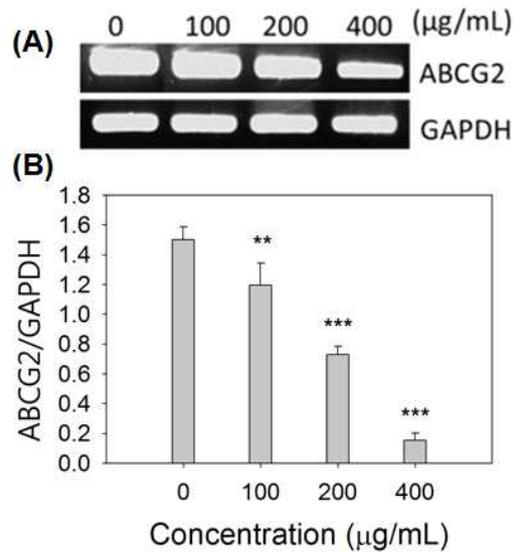


Figure. 11. Supercritical CO₂ extract from palsak down regulate multi-drug resistance gene ABCG2 in breast cancer stem cells.

2. GC/MS를 통한 재래 감귤 초임계 추출물 성분 분석

가. 이예감 초임계 추출물 성분

- 이예감 통과, 과피, 과육을 초임계 추출방법을 통하여 준비하고 GC/MS를 통하여 분석하였다. 휘발성 유기 화합물은 table 6.에 표현하였으며, 크로마토그래피는 Fig. 12를 통하여 나타내었다.

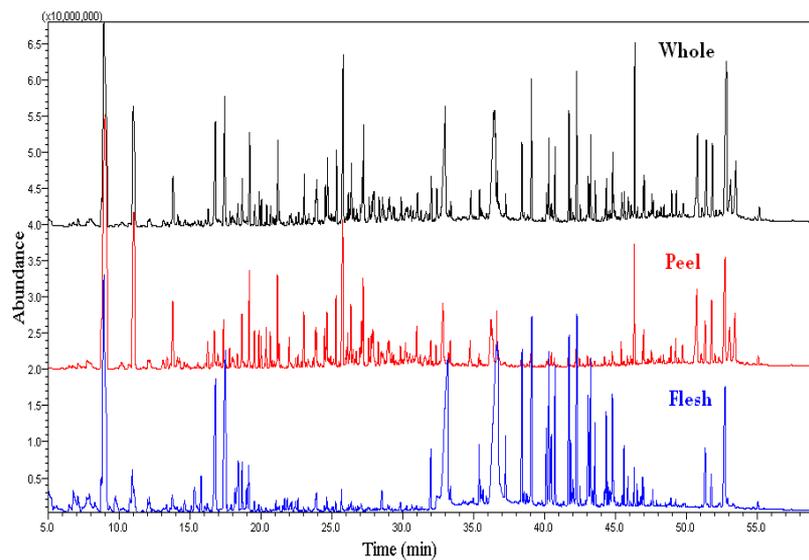


Figure. 12. GC-MS chromatogram of supercritical extract of Y:Yagam varieties from Jeju, Korea.

Table 6. Chemical compounds identified from supercritical extract of Y:Yegam variety.

SN	RT	RI	Name	MF	Area%		
					Whole	Peel	Flesh
1.	7.72	989	β -Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	0.09	0.10	0.18
2.	7.91	995	(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadienal	C ₇ H ₁₀ O	0.08	0.21	0.16
3.	8.76	1027	p-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	0.58	1.30	0.6
4.	8.925	1033	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	11.14	21.87	10.62
5.	9.69	1059	2-Octenal	C ₈ H ₁₄ O	0.08	0.12	0.16
6.	10.995	1100	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	4.49	8.32	0.94
7.	11.06	1102	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	0.08	nd	0.51
8.	12.02	1136	(<i>Z</i>)-Limoneneoxide	C ₁₀ H ₁₆ O	0.10	0.22	0.22
9.	13.10	1172	Nonanol	C ₉ H ₂₀ O	0.14	0.33	nd
10.	13.39	1180	4-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.09	0.40	0.39
11.	13.79	1193	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	1.18	2.03	0.28
12.	14.145	1204	Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	0.17	0.26	0.08
13.	14.27	1209	Octyl acetate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0.07	0.22	0.02
14.	14.64	1222	Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.13	0.18	0.22
15.	15.32	1246	Piperitenone oxide	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	0.12	nd	0.53
16.	15.56	1255	α -Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.09	0.18	nd
17.	15.80	1264	(<i>E</i>)-2-Decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	0.08	0.02	0.57
18.	16.295	1279	Perilla aldehyde	C ₁₀ H ₁₄ O	0.27	0.53	0.12
19.	16.795	1295	(<i>E,Z</i>)-2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	1.88	0.99	3.05
20.	16.96	1304	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	0.08	0.29	nd
21.	17.465	1320	(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	2.53	0.87	4.82
22.	18.03	1341	δ -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	0.11	0.58	nd
23.	18.68	1367	2-Undecenal	C ₁₁ H ₂₀ O	0.22	nd	0.60
24.	18.695	1365	Neryl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.57	0.82	Nd
25.	19.225	1383	Geranyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1.44	2.08	nd
26.	19.54	1398	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	0.08	nd	0.14
27.	19.575	1395	β -Elemene	C ₁₅ H ₂₄	0.33	0.76	nd
28.	19.89	1406	Decyl acetate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0.38	0.56	0.06
29.	20.045	1412	Perillyl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	0.29	0.48	0.07
30.	20.415	1428	β -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.24	0.66	0.07
31.	20.66	1435	α -Himachalene	C ₁₅ H ₂₄	0.18	0.62	nd
32.	20.81	1443	α -Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	0.12	0.19	nd
33.	21.06	1452	(<i>E</i>)-Geranylacetone	C ₁₃ H ₂₂ O	0.09	nd	0.10
34.	21.19	1459	β -Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	1.25	1.79	0.05
35.	21.325	1462	α -Humulene	C ₁₅ H ₂₄	0.14	0.37	nd
36.	21.68	1475	(<i>E</i>)-2-Dodecenal	C ₁₂ H ₂₂ O	0.05	nd	0.19

37.	22.00	1487	Germacrene-D	C ₁₅ H ₂₄	0.11	0.43	nd
38.	22.18	1493	Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	0.12	nd	0.13
39.	22.44	1503	α-Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	0.13	0.12	nd
40.	22.62	1512	α-Chamigrene	C ₁₅ H ₂₄	0.13	0.24	nd
41.	22.67	1513	2,4-Di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	0.19	nd	0.18
42.	23.07	1530	δ-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	0.68	1.15	0.06
43.	23.68	1555	Elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.04	0.16	nd
44.	23.94	1565	Dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0.50	nd	0.41
45.	23.95	1565	(E)-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.58	0.7	nd
46.	24.545	1588	Spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	0.49	0.66	0.06
47.	24.7	1594	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1.04	1.42	0.16
48.	27.26	1702	β-Sinensal	C ₁₅ H ₂₂ O	1.34	1.63	nd
49.	27.835	1729	isospathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	0.36	0.58	nd
50.	28.59	1763	Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.53	0.76	0.32
51.	29.905	1822	Nootkatone	C ₁₅ H ₂₂ O	0.38	1.03	0.14
52.	30.64	1857	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	0.32	0.49	0.09
53.	31.04	1875	Platambin	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0.61	0.92	nd
54.	32.025	1922	Pentadecanoic acid methyl ester	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	0.72	nd	0.73
55.	33.015	1971	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	4.92	2.05	9.36
56.	33.4	1989	Hexadecanoic acid, ethyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0.48	0.38	0.32
57.	35.36	2093	(Z,Z)-9,12-Octadecanoic acid methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	0.47	0.16	nd
58.	36.425	2150	(Z,Z)-9,12-Octadecanoic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	8.78	1.2	15.33
59.	36.63	2160	(Z)-9-Octadecanoic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	0.18	0.48	0.80
60.	37.28	2194	Docosane	C ₂₂ H ₄₆	0.42	0.33	1.00
61.	39.085	2295	Tricosane	C ₂₃ H ₄₈	1.96	0.10	4.08
62.	40.13	2356	2-Methyl tricosane	C ₂₄ H ₅₀	1.22	0.51	1.03
63.	40.755	2393	Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	0.93	0.82	1.98
64.	42.27	2494	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	2.42	0.16	3.53
65.	43.25	2568	Hexacosane	C ₂₆ H ₅₄	1.06	0.47	2.39
66.	44.805	2696	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	1.27	0.20	1.98
67.	45.88	2798	Octacosane	C ₂₈ H ₅₈	0.14	0.09	0.43
68.	46.375	2833	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	2.22	1.91	0.35
69.	50.8	3000<	Tangeritin	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	2.5	3.15	0.91
70.	51.41	3000<	δ5-Ergosterol	C ₂₈ H ₄₈ O	1.71	1.03	1.23
71.	51.845	3000<	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	1.39	1.54	0.58
72.	52.82	3000<	γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	5.38	3.96	3.28

73.	53.5	3000<	Nobilitin	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	1.62	1.82	nd
74.	55.15	3000<	Cycloartenol	C ₃₀ H ₅₀ O	0.29	0.27	nd
					76.59	78.27	75.61

- Carboxylic 산 (4), 알코올 (12), 알데하이드 (11), 에스테르 (10), 탄화수소 (25), 양성 케톤 (2) 기타 (10)로 분류되는 74가지 화합물이 이예감 추출물에서 발견되었다 (Fig. 13).

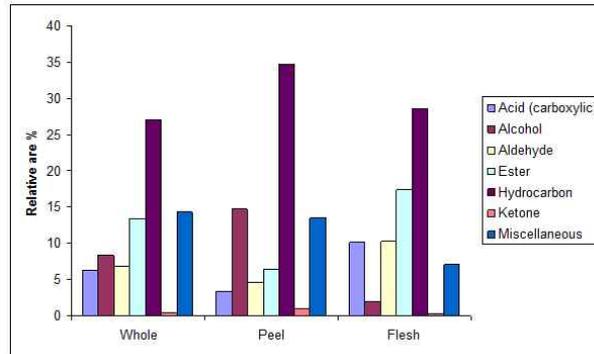


Figure. 13. Relative content of functional groups of volatile organic compounds identified in supercritical extract of Y:Yegam.

- 탄화수소는 가장 많은 부분인 27.07%를 차지하는 물질이었다. 주요 탄화수소 화합물에는 pentacosane (2.42%), hexacosane (1.06%) 및 tricosane (1.96%)와 같은 일부 알칸과 limonene (11.14%) 과 스쿠알렌 (2.22%)이었다 (Fig. 14).

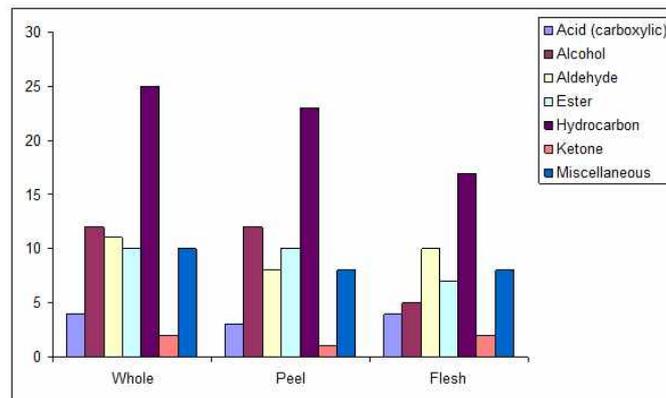


Figure. 14. Relative number of compounds belongs to functional groups identified in supercritical extract of Y:Yegam.

- Monoterpenoids는 3가지만 검출되었으며, 거기에 많은 수의 sesquiterpenoids가 추출물에 존재하였다. 대부분의 Sesquiterpene 관련 화합물은 대부분이 주기적 화합물이며 beta-farnesene (1.25%)을 제외한 나머지 물질들은 모두 1% 미만으로 검출되었다. Hydroban 알칸이 주요물질들의 비율 중 8% 이상을 차지하고 있었다. 마찬가지로,

13.38%의 esters는 두 번째 주요 그룹에 포함되었다. 지방산의 esters 중에서 특히 주요 esterified로 검출된 (Z, Z)-9,12-Octadecanoic 산 에틸 에스테르 (8.78%)가 우세하였다. Carboxylic acids, 특히 4가지의 지방산 역시 이예감 통과 추출물에 포함되어 있었다. Hexadecanoic acid (4.92%)가 그 중 주요 물질이었으며, 다른 물질들 역시 포화 지방산이었다. 알데하이드 화합물 중 monoterpenoidal 알데하이드드류가 주요한 그룹이었으며, 단지 sesquiterpenoidal aldehyde beta-sinesal (1.34%)만 이예감 통과 추출물에서 검출되었다. 이예감 통과 추출물에 포함된 miscellaneous 화합물은 약간의 flavone과 sterol과 같은 epoxy 화합물이 포함되어 있다. Tangeritin과 nobiletin과 같은 tow flavone물질도 검출되었으나, 그들의 구성비율은 높지 않다. 마찬가지로 스테로이드 성 화합물, γ -Sitosterol (5.38%), Stigmasterol (1.39%), δ^5 -Ergosterol (1.71%) 및 Cycloartenol (0.29%) 역시 검출되었다.

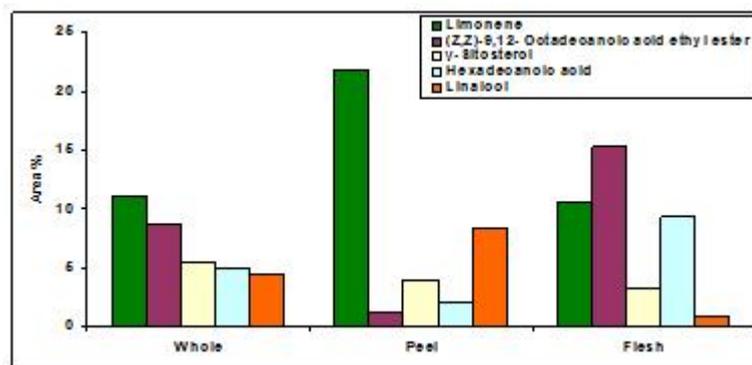


Figure. 15. Relative proportion of major five constituents in supercritical extract Yegam fruit.

- 위의 결과를 기준으로 이예감의 초임계 추출물의 주요 물질은 limonene으로 확인되었으며, 다른 주요 물질의 함유를 기준으로 Z,Z)-9,12- Octadecanoic acid ethyl ester, γ -Sitosterol, hexadecanoic acid and linalool 등이 함유된 것으로 확인하였다. 이예감은 제약 산업에 대한 유용한 에센셜 오일을 얻을 수 있을 것으로 예상된다 (Fig. 15).

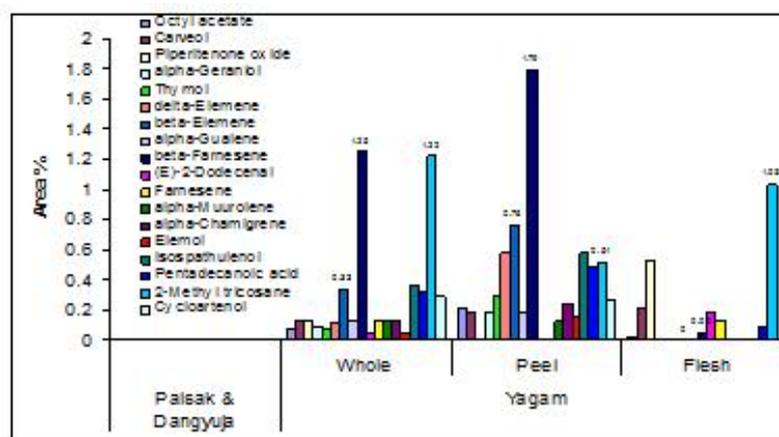


Figure. 16. Relative proportion of compounds those found in supercritical extract of Yegam citrus fruit but not in other two samples.

위의 주요 화합물의 비교 분석이 여기에 설명 되어 있다. 관련 있는 물질끼리의 비슷한 패턴이 발견되었으나, 몇몇 물질에 대해서는 과피나 과육부분에서는 발견되지 않았다. 흥미롭게 모두 21개의 물질이 대표적인 functional group이 결여되어 있었다 (Fig. 16).

나. 당유자 초임계 추출물 성분

- 당유자통과, 과육, 과피를 초임계 추출방법을 통하여 준비하고 GC/MS를 통하여 분석하였다. 휘발성 유기 화합물은 Table 7에 표현하였으며, 크로마토그래피는 Fig. 17을 통하여 나타내었다.

Table 7. Chemical compounds identified from supercritical extract of D:Dangyuja variety.

SN	RT	RI	Name	MF	Area%		
					Whole	Peel	Flesh
1.	7.78	991	β -pinene	C ₁₀ H ₁₆	1.93	0.50	1.01
2.	7.85	993	β -Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	4.77	0.05	0.91
3.	7.90	995	(E,E)-2,4-Heptadienal	C ₇ H ₁₀ O	0.44	nd	0.56
4.	8.97	1034	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	18.67	3.63	3.93
5.	10.99	1100	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0.65	0.78	0.18
6.	11.08	1103	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	0.23	nd	0.16
7.	12.07	1138	(<i>Z</i>)-Limoneneoxide	C ₁₀ H ₁₆ O	0.19	0.05	0.04
8.	12.19	1142	(<i>E</i>)-limoneneoxide	C ₁₀ H ₁₆ O	0.27	0.07	0.06
9.	12.60	1156	Citronellal	C ₁₀ H ₁₈ O	0.36	0.33	nd
10.	13.81	1193	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.43	0.88	0.15
11.	14.64	1222	Carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.18	0.09	0.15
12.	14.84	1229	β -Citronellol	C ₁₀ H ₂₀ O	0.19	0.44	nd
13.	15.25	1244	β -Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	0.15	0.22	0.09
14.	15.61	1256	α -Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.35	0.59	0.06
15.	15.78	1262	(E)-2-Decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	0.06	nd	0.61
16.	16.11	1273	α -Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	0.51	0.68	0.09
17.	16.78	1295	(E,Z)-2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	1.64	0.89	4.50
18.	17.44	1319	(E,E)-2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	1.97	1.28	6.32
19.	18.38	1353	Citronellyl acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	0.26	0.51	nd
20.	18.66	1363	2-Undecenal	C ₁₁ H ₂₀ O	0.42	nd	0.60
21.	18.69	1364	Neryl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.25	0.39	nd
22.	19.24	1383	Geranyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	2.2	4.36	0.3
23.	19.55	1394	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	0.62	nd	0.16
24.	19.56	1395	β -Cubebene	C ₁₅ H ₂₄	0.37	0.83	nd
25.	20.02	1412	Dimethyl anthranilate	C ₉ H ₁₁ NO ₂	0.11	nd	0.14
26.	20.05	1413	Perillyl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	0.14	0.23	nd

27.	20.42	1428	β -Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.29	0.39	0.10
28.	21.09	1453	(E)-Geranylacetone	C ₁₃ H ₂₂ O	0.2	0.38	0.76
29.	21.32	1462	α -Humulene	C ₁₅ H ₂₄	0.12	0.10	nd
30.	22.04	1488	Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	0.14	0.06	nd
31.	22.17	1495	Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	0.05	nd	0.23
32.	22.66	1513	2,4-Di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	0.12	0.40	0.43
33.	23.07	1530	δ -Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	0.49	1.06	0.10
34.	23.37	1542	Dihydroactinidiolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	0.12	0.33	nd
35.	23.80	1559	Dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0.43	0.5	0.19
36.	24.53	1588	Spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	0.3	0.97	0.04
37.	24.66	1595	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	0.12	nd	0.16
38.	24.69	1594	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	0.62	1.41	0.22
39.	24.89	1604	Salvia-4(14)-en-1-one	C ₁₄ H ₂₂ O	0.06	0.13	nd
40.	28.53	1760	Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.28	0.58	0.25
41.	29.90	1822	Nootkatone	C ₁₅ H ₂₂ O	0.72	1.50	nd
42.	31.02	1874	Platambin	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0.26	0.64	nd
43.	31.92	1917	(E,E)-Farnesyl acetone	C ₁₈ H ₃₀ O	0.20	0.55	nd
44.	32.04	1923	Pentadecanoic acid, methyl ester	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.35	1.57	4.74
45.	32.98	1969	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	4.44	3.72	9.94
46.	33.37	1990	Hexadecanoic acid, ethyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1.17	2.96	0.94
47.	35.17	2076	Xanthotoxin	C ₁₂ H ₈ O ₄	0.56	0.74	nd
48.	35.42	2095	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	0.87	1.44	2.39
49.	35.53	2101	(Z)-9-Octadecenoic acid methyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	0.5	0.09	0.81
50.	36.41	2149	(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	7.96	4.54	4.28
51.	36.72	2163	(Z)-9-Octadecenoic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	0.42	0.37	1.46
52.	37.28	2195	Docosane	C ₂₂ H ₄₆	0.33	0.38	1.41
53.	39.10	2296	Tricosane	C ₂₃ H ₄₈	1.84	0.54	6.16
54.	40.75	2396	Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	0.79	0.35	3.65
55.	42.27	2494	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	2.11	0.67	7.02
56.	43.60	2593	Hexacosane	C ₂₆ H ₅₄	0.36	0.38	4.17
57.	44.33	2655	Auraptene	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	1.27	1.71	nd
58.	45.60	2798	Octacosane	C ₂₈ H ₅₈	0.30	0.12	1.24
59.	46.35	2833	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	0.88	1.94	0.65
60.	48.93	3000<	Hentriacontane	C ₃₁ H ₆₄	0.57	0.23	0.15
61.	49.79	3000<	Vitamin E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	0.73	0.21	0.08

62.	50.73	3000<	Tangeritin	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	0.95	1.24	0.56
63.	51.38	3000<	δ5-Ergosterol	C ₂₈ H ₄₈ O	0.83	1.30	1.19
64.	51.81	3000<	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	0.46	1.01	0.54
65.	52.75	3000<	γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	2.97	5.09	3.59
66.	53.43	3000<	Nobiletin	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	0.44	0.53	nd
				73.98	56.93	77.47	

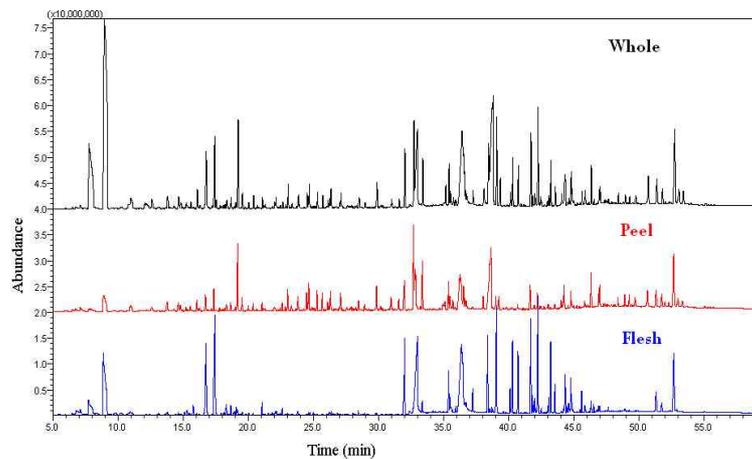


Figure. 17. GC-MS chromatogram of supercritical extract of Dangyuja varieties from Jeju, Korea.

- 66가지의 물질이 당유자 통과에서 분리되었으며, carboxylic acid (3), alcohol (9), aldehyde (9), ester (10), hydrocarbon (19), ketone (7), miscellaneous (10)로 분류할 수 있다 (Fig. 18, 19).

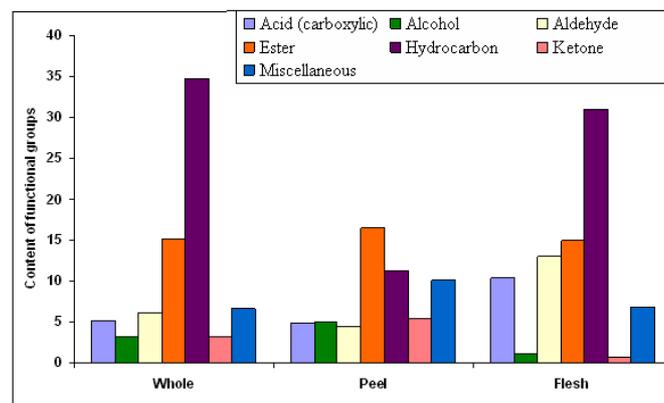


Figure. 18. Relative content of functional groups identified from Dangyuja fruits.

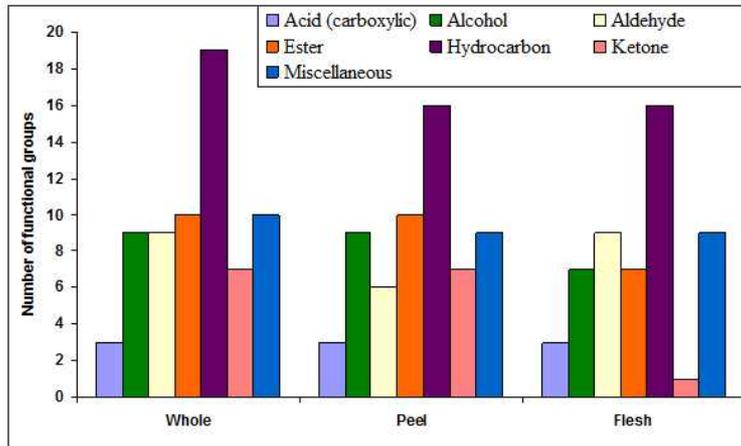


Figure. 19. Relative content of number of compounds based upon the functional groups identified from Dangyuja fruits.

- 당유자 추출물에서 발견된 다양한 phytochemical 물질들은 매우 다양한 범위의 생리활성을 가지고 있다. 추출물에서 발견된 몇몇 주요 물질들의 특징을 소개하고자 한다. terpenoids라고 분리된 물질과 linalool, α -terpineol and geraniol은 주요 산화된 monoterpenes이다. 또한 monoterpenes은 보통 안전물질로 인식되고 있지만, 몇몇 식물 에센셜 오일의 monoterpenes는 genotoxic하며 발암물질로도 알려져 있다. Species에서 많은 양이 검출된 linalool은 항균성을 가지고 있는 것으로 알려졌다. 당유자 오일의 주요 물질 중 하나인 linalool은 식품첨가물과 약물로써 사용되고 있다. Caryophyllene은 나무향 (woody spicy fragrance)을 가지고 있으며, 항암물질로도 알려져 있다. Caryophyllene은 나무향 (woody spicy fragrance)을 가지고 있으며, 항암물질로도 알려져 있다. 몇몇의 산화된 monoterpenes 역시 당유자 추출물에서 검출되었다. 결과적으로 monoterpen phenols 은 이미 이전에 항진균성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 포자형성을 억제하는데 사용될 수 있을 것으로 예상된다.
- 당유자 초임계 추출물의 주요 물질은 limonene으로 확인되었으며, 다른 주요 물질의 함유를 기준으로 (Z,Z)-9,12-Octadecanoic acid ethyl ester, γ -Sitosterol , hexadecanoic acid and gamma-sitosterol 등이 함유된 것으로 확인하였다 (Fig. 20).

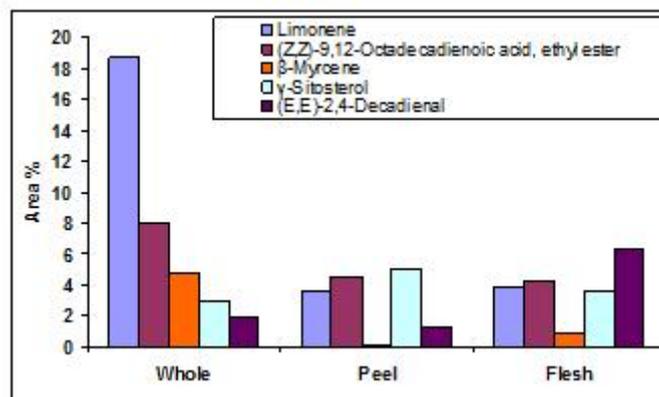


Figure. 20. Relative proportion of major five constituents in supercritical extract of

Dangyuja fruit.

- 관련 있는 물질끼리의 비슷한 패턴이 발견되었으나, 몇몇 물질에 대해서는 과피나 과육 부분에서는 발견되지 않았다. 흥미롭게 모두 15개의 물질이 대표적인 functional group 이 결여되어 있었다.
- 탄화수소 중 terpenoids와 산화된 terpenoids 가 각 부분의 주요 화합물로 확인되었으며, Limonene은 여전히 적은 양만 포함되어 있었다 (18.67%). 6개의 신규 화합물이 발견되었으며, 다른 두 종류에서는 발견되지 않았다. 모두 9가지의 지방산이 발견되었으며, 여기에는 6개의 esterified된 것이 17.42%를 차지하고 있다. 과육에서는 3가지의 화합물이, 과피에서는 2가지의 화합물이 통과에서는 검출되지 않았다. Beta-citronellol 이 당유자에서 새로 발견되었으며, 다른 두 샘플보다 많은 부분을 차지하고 있었다. 전체적으로 통과에서 1.11%, 과피에서 0.97%, 과피에서 0.36%의 물질이 다른 물질들과 달랐다(Fig. 20). (E)-limonene oxide, citronella, beta-citronellol, hexadecane etc 과 같은 화합물은 표준물질로 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

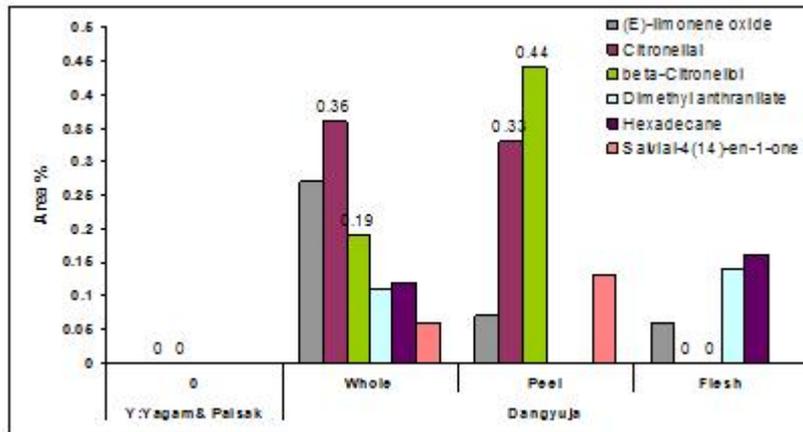


Figure. 21. Relative proportion of constituents those found in supercritical extract of Dangyuja fruit but not in other two varieties.

다. 팔삭 초임계 추출물 성분

- 팔삭추출물도 초임계 추출법을 이용하여 준비하였으며, GC/MS로 분석하였다. 검출된 휘발성유기 화합물의 목록은 Table 8에 표현하였으며, 크로마토그래피는 Fig. 22로 나타내었다.
- 탄화수소 화합물이 가장 높은 비율을 차지하는 화합물이었다. 주요 탄화수소 화합물은 tricosane (5.44%), Pentacosane (3.96%)과 limonene (2.41%) alkane을 주로 포함하는 것으로 확인되었다. monoterpenoids 과 sesquiterpenoids은 각각 4개가 검출 및 확인되었다. 대부분의 Sesquiterpene 관련 화합물은 대부분이 주기적 화합물이며 limonene을 제외한 물질들은 모두 1% 미만으로 검출되었다. Hydroban 알칸이 주요물질들의 비율 중 15% 이상을 차지하고 있었다 (Fig. 23).
- 비슷하게 aurraptene (14.00%)의 영향으로, nootkatone (3.39%) 및 일부 비주류의 다른 성분, 양성 케톤 그룹 (18.03%)들이 세 번째 주요 구성 물질로 구성되었다.

- 팔삭 통과 추출물에서 분리된 65가지의 화합물이 각각 carboxylic acid (6), alcohol (11), aldehyde (8), ester (8), hydrocarbon (18), ketone (7), miscellaneous (8)으로 분류되었다 (Fig. 24, 25).

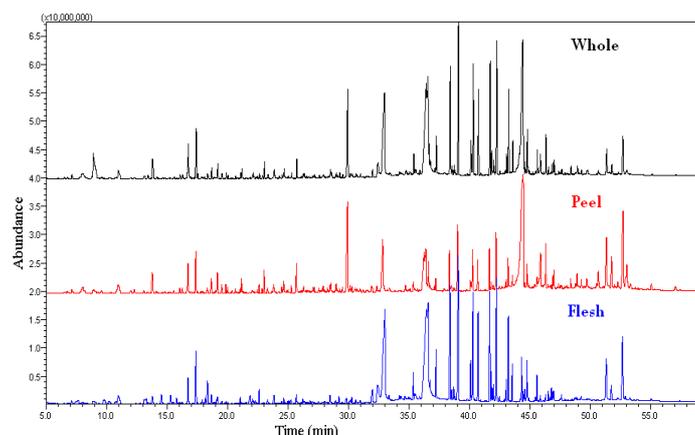


Figure. 22. GC-MS chromatogram of supercritical extract of Palsak fruit from Jeju Korea.

Table 8. Chemical compounds identified from supercritical extract of P:Palsak variety.

SN	RT	RI	Name	MF	Area%		
					Whole	Peel	Flesh
1.	7.77	991	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	0.12	nd	nd
2.	7.83	993	β -Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	0.11	0.22	nd
3.	8.77	1027	p-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	0.12	0.03	0.03
4.	8.90	1032	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	2.41	0.25	0.35
5.	9.78	1062	2-Octenal	C ₈ H ₁₄ O	0.12	0.05	0.49
6.	10.65	1090	Linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.04	0.15	0.09
7.	10.97	1099	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0.55	0.38	0.85
8.	13.18	1174	Octanoic acid	C ₈ H ₁₆ O ₂	0.14	0.15	0.28
9.	13.41	1181	4-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.17	0.08	0.06
10.	13.80	1193	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.95	1.38	0.41
11.	15.775	1262	(E)-2-Decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	0.04	nd	0.21
12.	16.09	1272	α -Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	0.14	0.33	0.06
13.	16.29	1279	Perilla aldehyde	C ₁₀ H ₁₄ O	0.13	0.34	0.05
14.	16.76	1294	(E,Z)2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	1.13	1.93	0.98
15.	17.42	1318	(E,E)-2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	1.55	2.79	1.81
16.	18.36	1352	Citronellyl acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	0.19	0.36	nd
17.	18.65	1362	2-Undecenal	C ₁₁ H ₂₀ O	0.14	nd	0.28
18.	18.68	1364	Neryl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.3	0.97	nd
19.	19.20	1381	Geranyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.48	1.33	0.22
20.	19.56	1391	β -Cubebene	C ₁₅ H ₂₄	0.19	0.58	nd
21.	19.89	1406	Decyl acetate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0.14	0.58	0.05
22.	20.03	1412	Prillyl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	0.1	0.37	0.06

23.	20.37	1426	(E)-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	0.03	0.19	nd
24.	21.08	1453	(E)-Geranylacetone	C ₁₃ H ₂₂ O	0.13	0.34	0.16
25.	21.14	1456	Citronellol	C ₁₀ H ₂₀ O	0.21	0.95	nd
26.	22.16	1493	Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	0.10	nd	0.06
27.	22.66	1512	2,4-Di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	0.13	0.56	0.4
28.	23.06	1529	δ-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	0.44	1.51	0.03
29.	23.36	1541	Dihydroactinidiolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	0.13	0.31	0.15
30.	23.87	1562	Dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0.31	0.51	0.33
31.	23.88	1563	Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.05	0.27	nd
32.	24.52	1587	Spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	0.1	0.37	0.06
33.	24.69	1594	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	0.27	0.75	0.17
34.	25.69	1638	α-Copaen-8-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	1.05	1.94	nd
35.	27.21	1700	β-Sinensal	C ₁₅ H ₂₂ O	0.09	0.29	nd
36.	28.52	1759	Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.25	0.45	0.25
37.	29.94	1823	Nootkatone	C ₁₅ H ₂₂ O	3.39	5.91	0.15
38.	30.64	1857	Umbelliferone	C ₉ H ₆ O ₃	0.12	0.20	nd
39.	30.96	1873	Platambin	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	0.02	0.2	0.08
40.	31.96	1919	(E,E)-Farnesyl acetone	C ₁₈ H ₃₀ O	0.17	0.38	nd
41.	32.01	1921	Hexadecanoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0.17	nd	0.53
42.	32.98	1969	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	6.74	3.42	10.77
43.	34.22	2045	Heptadecanoic acid	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0.12	nd	0.2
44.	35.08	2076	Xanthotoxin	C ₁₂ H ₈ O ₄	0.09	0.19	0.27
45.	35.41	2098	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	0.57	0.41	1.48
46.	35.54	2099	(Z,Z)-9,12-Octadecenoic acid methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	0.22	nd	1.04
47.	35.62	2102	(Z)-9-Octadecenoic acid methyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	0.13	nd	0.03
48.	36.53	2147	(Z)-9-Octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	16.79	2.74	20.79
49.	37.29	2194	Docosane	C ₂₂ H ₄₆	1.13	0.60	1.98
50.	39.11	2296	Tricosane	C ₂₃ H ₄₈	5.44	4.34	6.95
51.	40.77	2396	Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	2.33	2.0	2.62
52.	41.96	2473	Pentacosanol	C ₂₅ H ₅₀ O	0.53	0.28	0.55
53.	42.28	2495	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	3.96	3.70	4.46
54.	43.61	2594	Hexacosane	C ₂₆ H ₅₄	1.25	1.07	2.43
55.	44.45	2631	Auraptene	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	14.00	8.39	2.80
56.	44.81	2696	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	1.55	nd	1.5
57.	45.88	2797	Octacosane	C ₂₈ H ₅₈	0.56	nd	0.21
58.	46.35	2833	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	1.18	2.56	0.18
59.	48.96	3000<	Hentriacontane	C ₃₁ H ₆₄	0.36	nd	nd

60.	49.78	3000<	Vitamine E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	0.26	1.69	nd
61.	50.69	3000<	Tangeritin	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	0.18	1.05	nd
62.	51.37	3000<	δ ⁵ -Ergosterol	C ₂₈ H ₄₈ O	1.1	3.25	2.14
63.	51.80	3000<	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	0.44	2.06	0.67
64.	52.71	3000<	γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	1.8	5.08	nd
65.	53.37	3000<	Nobilitin	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	0.08	0.31	nd
				77.23	70.54	69.72	

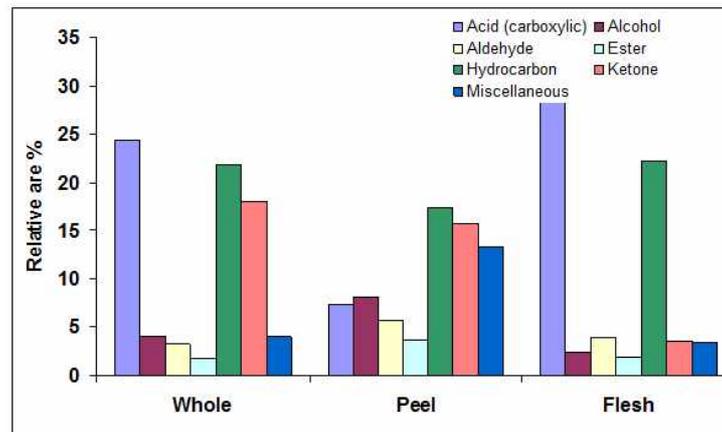


Figure. 23. Relative content of functional groups identified from supercritical extract of Palsak.

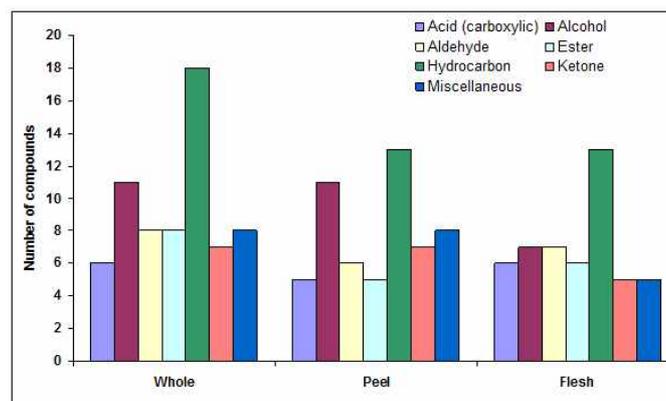


Figure. 24. Relative content of number of compounds based upon the functional groups in Palsak fruit.

- 4개의 포화지방산과 1개의 불포화지방산으로 구성된 카복실산이 주요 phytochemical이었다. 그것들은 총 24.35%를 차지하였으며 (Z)-9-octadecanoic acid (16.79%)로 되어 있다. 흥미롭게도 (Z)-9-octadecanoic acid이 과육에서 차지하는 비중이 높았다. 이 물질은 당유자와 이예감과 비교하였을 때 제주도 지방에서 자라는 감귤류에 대한 식별에 사용될 수 있을 것이다 (Fig. 25).

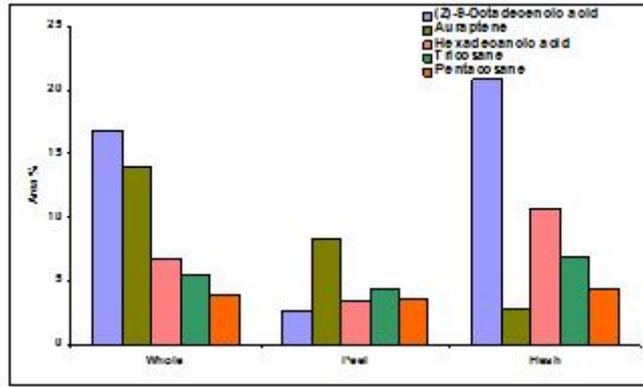


Figure. 25. Relative proportion of major five constituents in supercritical extract of Palsak fruit.

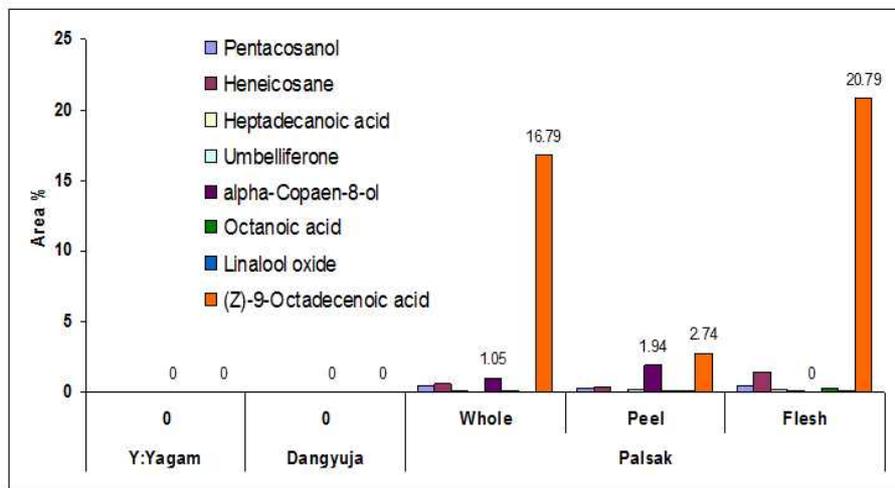


Figure. 26. Relative proportion of compounds those found in supercritical extract of Palsak fruit but not in other two varieties.

- 알코올 복합체의 수는 많으나, 모든 것에 대한 비율은 적은 양이다 (3.76%). Monoterpenoidal 알콜, linalool (0.55%), alpha-terpineol (0.95%) 등이 다른 샘플인 이에감과 당유자에 비교하였을 때 적은 양이 검출되었다.
- 알데하이드 화합물 가운데 monoterpenoidal 알데하이드가 지배적인 그룹 및 하나의 화합물 sesquiterpenoidal에 속하는 알데하이드 즉 베타-sinesal (0.09%)이 팔삭 통과에서 검출되었으며, 이에감 샘플과 비교하였을 때 이에감에서는 오직 하나의 sesquiterpenoid compound, beta-sinesal (1.34%)이 검출되었다.
- 팔삭 통과 추출물에 포함된 miscellaneous 화합물은 약간의 flavone과 sterol과 같은 epoxy 화합물이 포함되어 있다. Tangeritin (0.18%)과 nobiletin (0.08%)과 같은 tow flavone물질도 검출되었으나, 그들의 구성 비율은 높지 않다. 마찬가지로 스테로이드성 화합물, γ -Sitosterol (1.18%), Stigmasterol (0.44%), δ 5-Ergosterol (1.1%)이 검출되었으며, 팔삭 통과 추출물에서는 이에감 통과 추출물과는 달리 Cycloartenol이 검출되지 않았다.
- 위의 결과를 기준으로 팔삭 초임계 추출물의 주요 물질은 limonene으로 확인되었으며,

다른 주요 물질의 함유를 기준으로 (Z)-9-Octadecanoic acid, γ -Sitosterol, Auraptene and limonene 등이 함유된 것으로 확인하였다. 탄화수소와 산화된 탄화수소가 주요 구성물로 terpenoids 주요 화합물로 확인되었으며, 지방산과 에스터화된 형태가 다량 발견되었다. Limonene은 매우 적은 양만 포함되어 있었다 (2.41%). Auraptene (14.00%)은 다른 샘플들에 비해 많은 양이 포함되어 있었다. 8개의 신규 화합물이 발견되었으며, 다른 두 종류에서는 발견되지 않았다. (Z)-9-Octadecanoic acid가 가장 많은 양을 포함하고 있었으며, 새로이 발견되었다. (Z)-9-Octadecanoic acid (20.79%)은 마커로 사용될 수 있을 것이다. 전체적으로 통과에서 19.26%, 과피에서 5.87%, 과피에서 23.47%의 물질이 다른 재래감귤과는 달랐다.

- 일반적인 화합물외에도 세 종류의 재래감귤 초임계 추출물의 성분을 비교 분석한 결과에서는 팔삭 과육을 제외한 모든 샘플에서 탄화수소가 지배적이었으며, 에스터지방산은 당유자에서 주요성분이나 팔삭에서는 매우 적은 양이 포함되었다. 이예감은 매우 적은 양의 케톤이 포함되었으나 팔삭에서는 높은 농도를 나타내고 있다. 알코올화합물은 이예감에서만 지배적인 물질로 발견되었다 (Fig. 26, 27).

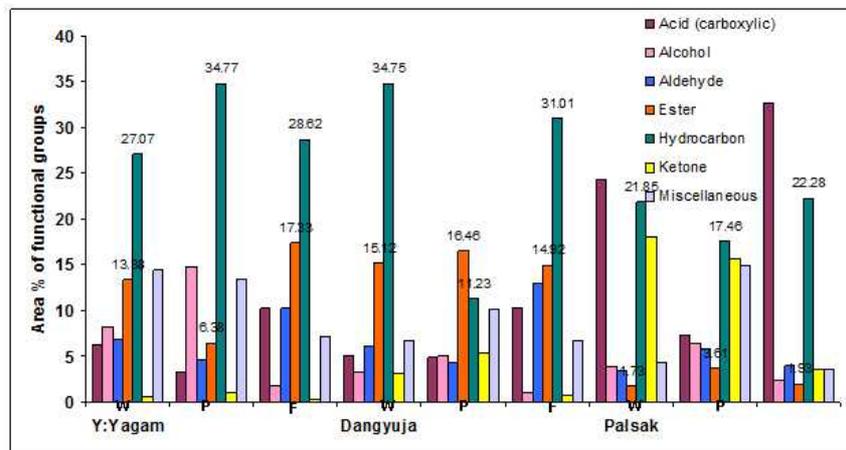


Figure. 27. Comparative profile of functional groups among the fruit samples.

제 2절 재래감귤 미성숙과 추출물의 세포변이억제 효능 및 성분 분석

1. 주원료 선정을 위한 추출물의 암세포증식 억제 및 암세포사멸 효능 평가

가. 암세포에서의 미성숙 재래감귤의 열수, 80% 에탄올 추출물들에 대한 세포증식 억제 효과 탐색

- 2011년 10월 참여기업인 (e)제주영농조합으로부터 당유자, 이예감, 팔삭 성숙과일을 확보한 후 농약 및 기타 불순물의 제거를 위해 수확 즉시 물로 2회 세척하였다. 과육과 과피를 분리하고 -70 °C deep freezer에서 3일간 동결한 후, 72시간 동결건조 하였다. 열수 추출의 경우, 동결건조 시킨 제주 재래감귤 과피, 과육, 통과를 각각 마쇄 시킨 뒤, 1:30 으로 DW에 넣어준 후 1시간동안 105 °C 1.2기압에서 추출하였다. 필터한 후 농축시키고 동결 건조하여 상온 암조건에서 보관하고 DMSO에 녹여 사용하였다. 80% EtOH 추출의 경우, 동결건조 시킨 제주 재래감귤의 과피, 과육, 통과를 각각 마쇄 시킨 뒤, 각각을 80% ethanol에서 시료 대 용매의 비율을 1:30으로 하여 45분 간 초음파 처리하여 얻은 추출물을 농축시키고 동결 건조한 후, DMSO에 녹여 실험에 사용하였다. 실험실에서 제조한 에탄올, 열수추출물의 수율은 아래 Table 9과 같다.

Table 9. Yield of Hot water and 80% ethanol extract.

Sample		열수 추출물 추출량 (g)	수율 (%)	80% 에탄올 추출물 추출량 (g)	수율 (%)
당유자	과육	2.82	56.4	1.84	36.8
	과피	2.43	40.0	1.99	39.8
	통과	1.55	31.0	1.92	38.4
이예감	과육	2.75	55.0	2.39	47.8
	과피	2.32	46.4	1.78	35.6
	통과	2.71	54.2	2.48	49.6
팔삭	과육	3.65	73.0	2.98	59.6
	과피	1.81	36.2	1.96	39.2
	통과	2.85	57.0	2.36	47.2

(1) 80% ethanol 미성숙 재래감귤 과피 추출물의 암세포증식 억제 및 암세포사멸 효능 평가

- 1차년도 연구결과에서 성숙 재래감귤 열수추출물과 80% ethanol 추출물의 경우 암세포 사멸 활성이 거의 확인되지 않았던 점과는 대조적으로, 재래감귤 미성숙 과피 80% ethanol 추출물의 경우 암세포 사멸 효능을 나타냈다. 위암세포주인 AGS 세포에 대하여 MTT Assay를 실시한 결과 500 µg/mL의 농도까지 농도 의존적으로 세포 사멸이 나타났으며 이예감, 당유자, 팔삭 과피 순서로 세포 생존율이 낮게 나타났다. 시간 의존적인 실험에서 72 시간에서도 48 시간과 마찬가지로 세포 생존율이 크게 감소하지 않는 것이 관찰되었다 (Fig. 28A and B). 이와 대조적으로 자궁암세포주인 HeLa 세포에 대해 실시한 MTT assay결과, 팔삭 과피 추출물에서 다른 과피 추출물에 비해 세포 생존율을 뚜렷이 떨어뜨리는 것을 확인했으며, 72 시간에서는 500 µg/mL 농도까지 농

도 의존적으로 세포사멸이 이루어지고 있는 것을 확인하였다 (Fig. 28C and D). 이를 통해 미성숙 재래감귤 과피 80% 에탄올추출물에 의한 자궁암 세포에 대한 항암효능을 확인할 수 있었다.

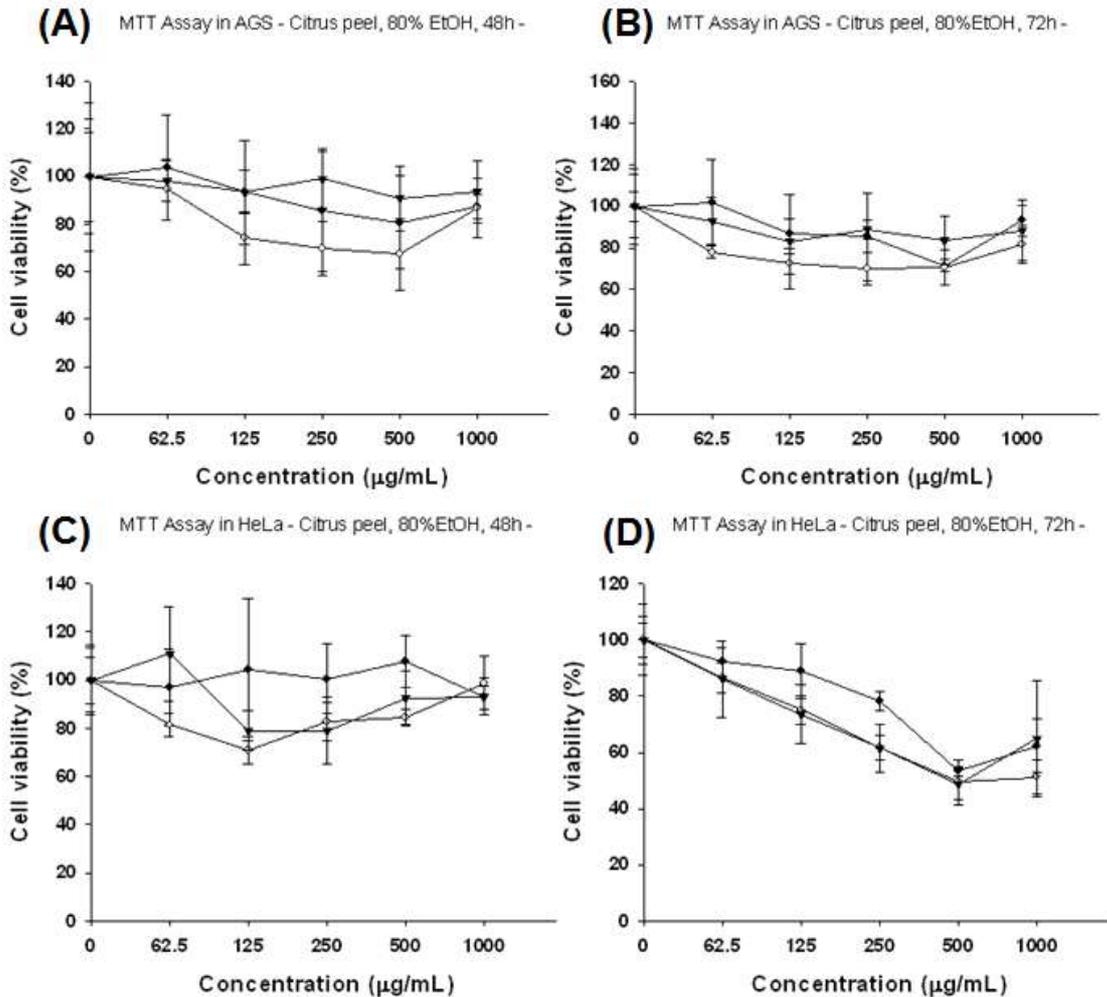


Figure. 28. Jeju traditional immature citrus peel 80% ethanol extracts inhibits the cell proliferation on AGS and HeLa cell lines. (A and B) Immature peel and flesh supercritical extracts were treated in AGS on 48 h (A) and 72 h (B), respectively. (C and D) Immature peel and flesh supercritical extracts were treated in HeLa on 48 h (C) and 72 h (D), respectively (●: 당유자, ○: 이예감, ▼: 팔삭).

(2) 암세포에서의 미성숙 재래감귤 초임계 과피 추출물들의 세포증식 억제 효과 탐색

- 초임계 추출의 경우, 동결건조 시킨 제주 미성숙 재래감귤의 과피, 과육, 통과를 각각 마쇄시킨 뒤, 2시간 동안 1 L Extractor로 300 bar, 50 °C에서 초임계 추출법을 사용하여 추출하였다. 그 중 이예감 과육의 경우 1시간 30분 동안 추출하였다. 이후 추출물들은 상온에서 암 조건에 보관하여 사용 시 DMSO에 녹여 사용하였다. 추출조건 (1 L Extractor, 300 bar, 50 °C, 2 hr)에서 실시한 초임계 추출물의 수율은 아래 표 10과 같다.

Table 10. Yield of Hot water and 80% ethanol extract.

샘플명		시료량 (g)	추출량 (g)	추출수율 (%)
당유자	과육	385	6.11	2.01
	과피	277.36	3.61	0.29
	통과	368.1	7.4	1.3
이예감	과육	375.07	1.1	0.29
	과피	281.34	2.8	0.995
	통과	315.24	6.21	1.97
팔삭	과육	320.12	6.74	2.11
	과피	300.48	4.42	1.47
	통과	350.5	9.29	2.65

- MTT-assay를 통하여 human gastric cancer cell인 AGS와 human cervical cancer cell인 HeLa cell에 대해서 제주 미성숙 재래감귤 초임계 추출물의 항암 효능을 측정한 결과 48시간 처리 시 과육 (A) 보다는 과피 (B)에서 세포의 성장억제에 효능이 좋은 것으로 나타났다 (Fig. 29A and B). Cell line 별로 비교를 해 보았을 때, AGS보다는 HeLa에서 과피의 세포사멸 효능이 우수함을 확인할 수 있었다.

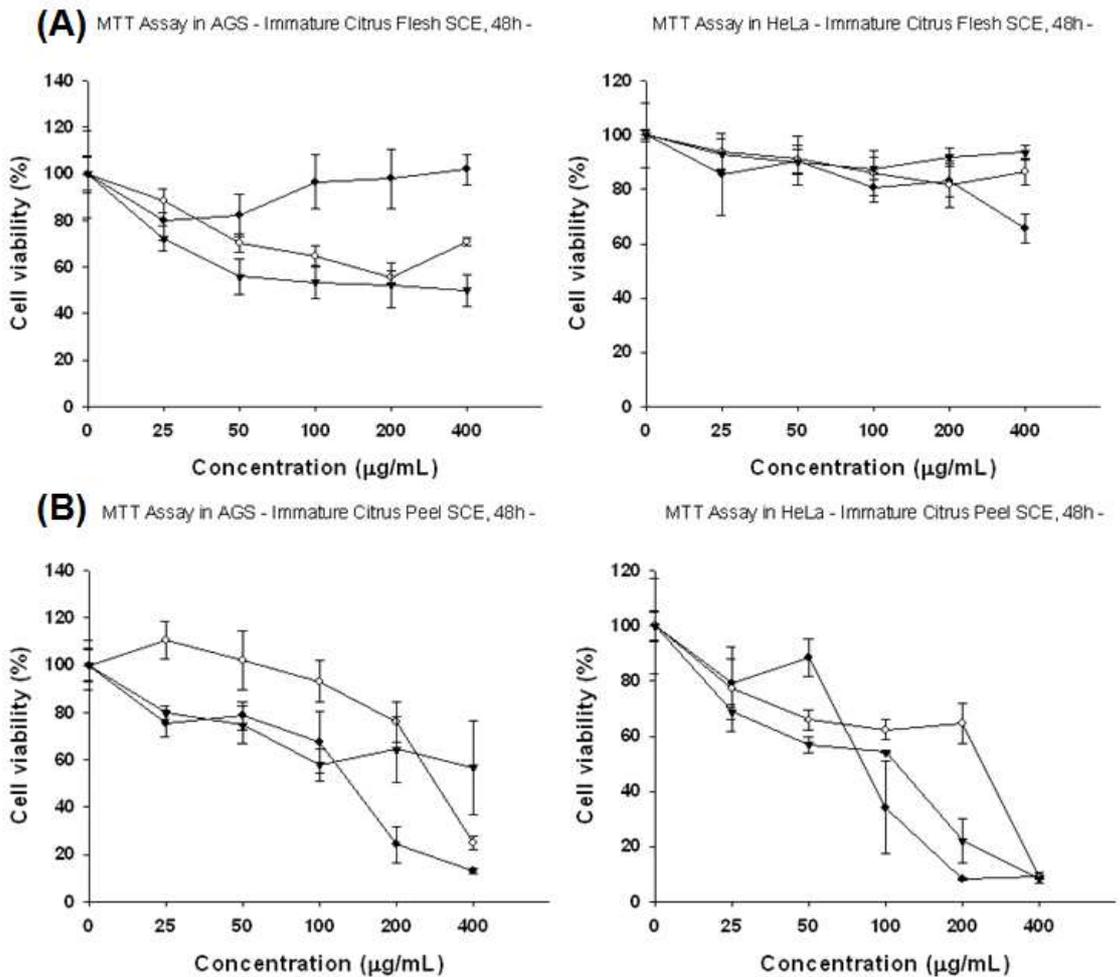
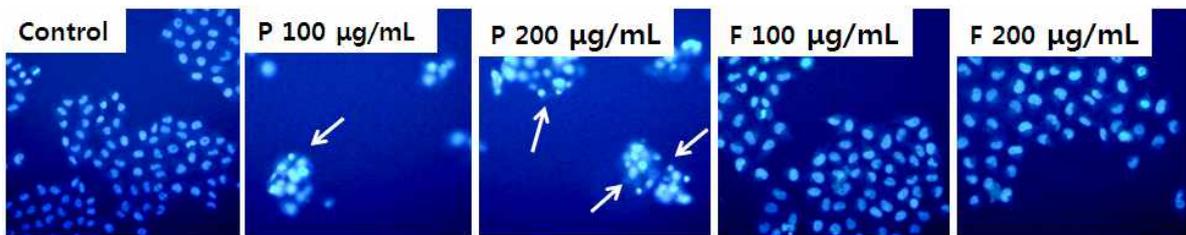


Figure. 29. Jeju traditional immature citrus super critical extract inhibits the cell

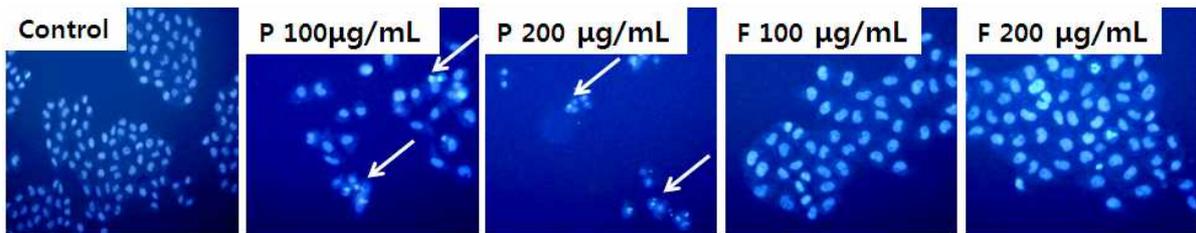
proliferation on AGS and HeLa cell lines. (A and B) Immature flesh supercritical extracts was treated in AGS (A) and HeLa (B) on 48 h. (C and D) Immature peel supercritical extracts was treated in AGS(C) and HeLa(D) on 48 h (●: 당유자, ○: 이예감, ▼: 팔삭).

- MTT Assay를 통하여 확인한 미성숙 재래감귤 초임계 추출물에 의한 세포사멸과 apoptosis와의 연관성을 확인하기 위하여 각각의 추출물을 HeLa세포에 농도별로 처리하여 세포 모양을 형광현미경으로 관찰 하였다. 재래감귤 종과는 관계없이 과육 (F) 추출물에서는 control과 비교하여 변화가 없었지만, 과피 (P) 추출물에서는 apoptotic body가 형성됨을 확인 할 수 있었다 (Fig. 30).

A: 당유자



B: 팔삭



C: 이예감

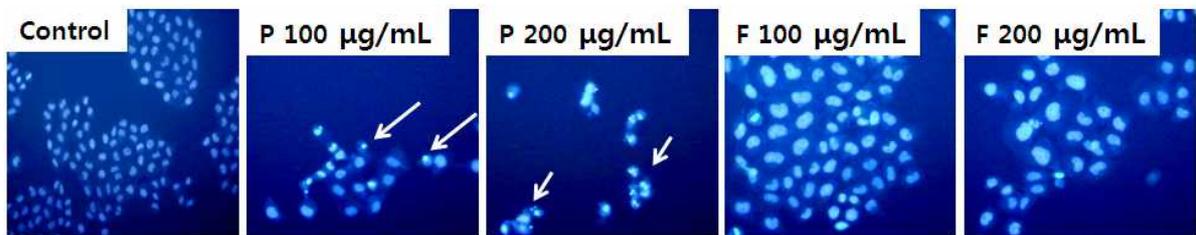
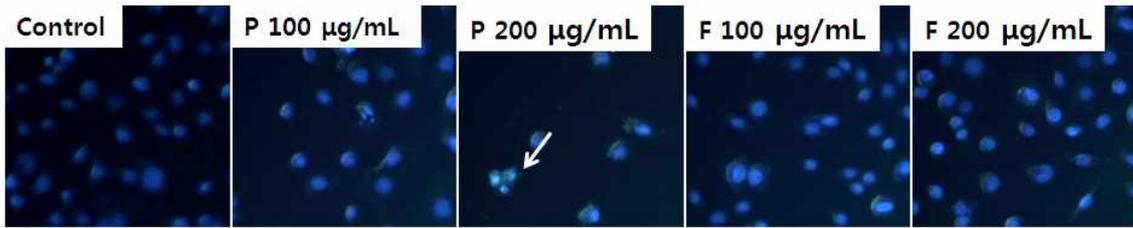


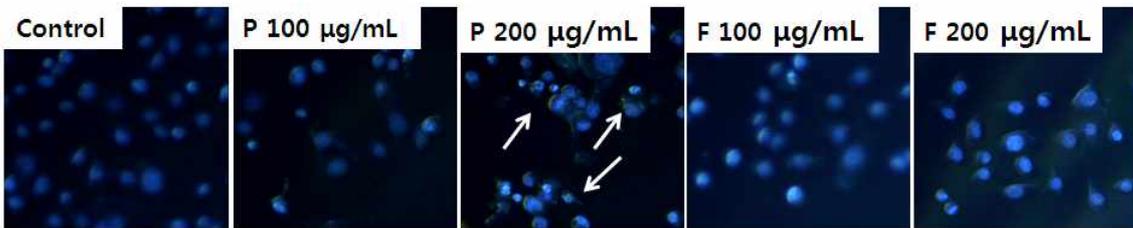
Figure. 30. Effect of Jeju traditional immature citrus super critical extract on cell morphology (A: 당유자, B: 팔삭, C: 이예감), (P: 과피, F: 과육).

- 위암세포주인 AGS에도 자궁암세포주인 HeLa와 마찬가지로 Hoechst33342 staining으로 세포 모양을 현미경으로 관찰 하였을 때, 과육에서는 변화가 없었지만 과피 200 µg/mL 농도에서 apoptotic body를 확인 할 수 있었다 (Fig. 31).

A: 당유자



B: 팔삭



C: 이예감

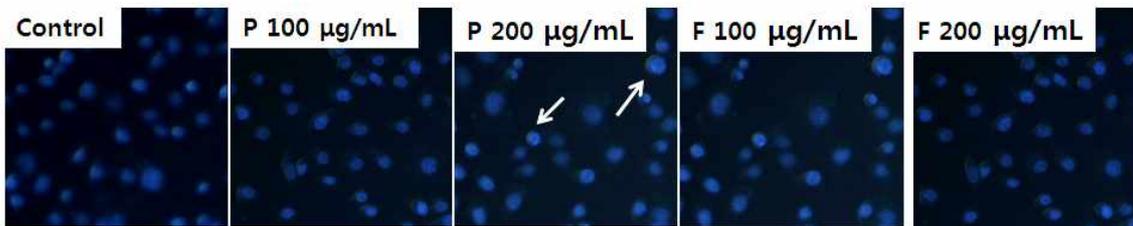


Figure. 31. Effect of Jeju traditional immature citrus super critical extract on cell morphology (A: 당유자, B: 팔삭, C: 이예감), (P: 과피, F: 과육).

- Hoechst33342 staining을 통해 세포에 변화를 주지 않았던 과육추출물을 제외하고 제주 미성숙 재래감귤 과피 초임계 추출물을 처리한 후 HeLa 세포와 AGS 세포의 주기를 FACS analysis를 통해 측정하였다 (Table 11, 12). MTT assay 결과에서 가장 좋은 효과를 나타내었던 미성숙 재래감귤 과피 추출물들을 FACS analysis로 cell cycle을 확인한 결과 sub-G1기의 증가를 확인할 수 있었다. 이를 통하여 미성숙 재래감귤 과피 초임계 추출물들은 apoptosis를 통하여 세포의 죽음을 유도하는 것으로 생각되어진다. 이예감 미성숙 과피 초임계 추출물 200 µg/mL 농도 처리 시 HeLa세포와 AGS 세포 모두에서 다른 재래감귤 추출물보다 sub-G1기의 현저한 증가가 관찰되었다.

Table 11. Analysis of % of Sub G1 phase in the HeLa cells treated with peel extracts.

HeLa		당유자		이예감		팔삭	
µg/mL	Control	100	200	100	200	100	200
Sub-G1	1.86	32.27	28.92	5.62	40.45	5.62	23.67
G1	56.25	22.95	29.31	64.54	35.01	64.54	38.74
S	16.45	19.93	24.73	11.54	12.66	11.54	18.85
G2/M	25.84	22.49	17.91	18.55	12.50	18.55	19.24

Table 12. Analysis of % of Sub G1 phase in the AGS cells treated with peel extracts.

AGS		당유자		이예감		팔삭	
µg/mL	Control	100	200	100	200	100	200
Sub-G1	4.53	14.79	34.49	12.86	40.10	9.00	16.08
G1	52.15	27.64	26.75	38.81	22.60	49.08	41.32
S	17.11	12.37	19.36	10.15	19.64	12.14	9.72
G2/M	26.65	45.64	20.35	38.17	17.99	29.76	32.80

2. GC/MS를 통한 미성숙 재래감귤 초임계 추출물 성분 분석

가. 미성숙 당유자 초임계 추출물 성분분석

- '미성숙 당유자 통과, 과피, 과육을 초임계 추출물의 조성을 GC/MS를 통하여 분석하였다. 휘발성 유기 화합물은 Table 13에 표현하였으며, 크로마토그래피는 Fig. 32을 통하여 나타내었다.

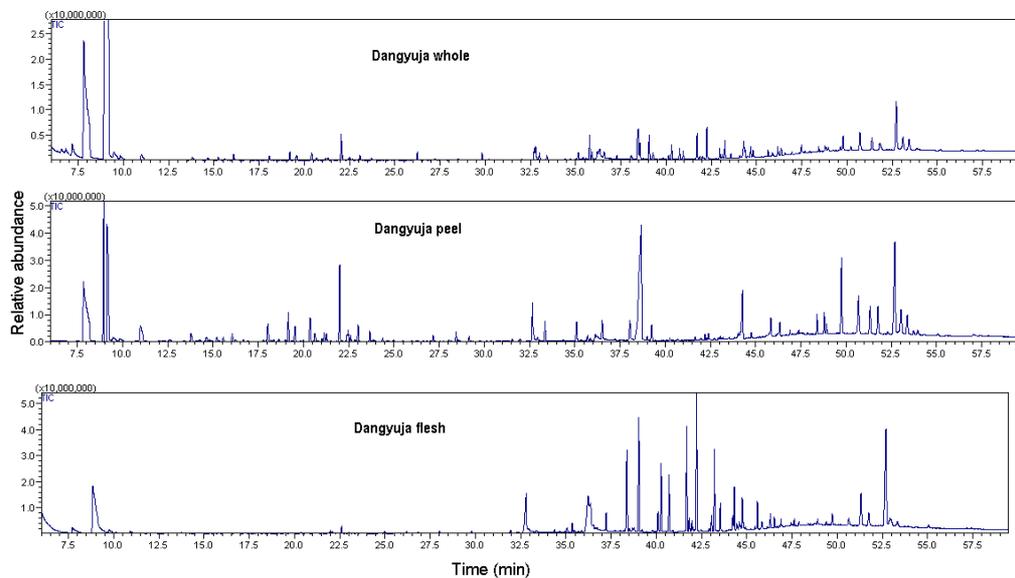


Figure. 32. GC-MS chromatogram of supercritical extract of immature dangyuja varieties from Jeju, Korea.

Table 13. Chemical compounds identified from supercritical extract of immature dangyuja variety.

SN	RT	RI	Name	MF	Area %		
					Whole	Peel	Flesh
1	7.81	992	beta-Myrcene	C10H16	20.44	12.41	
2	8.98	1035	Limonene	C10H16	51.49	13.09	1.73
3	11.01	1100	Linalool	C10H18O		1.94	
4	13.78	1193	alpha-Terpineol	C10H18O		0.65	
5	15.21	1243	Z-Citral	C10H16O		0.25	
6	15.56	1255	trans-Geraniol	C10H18O		0.23	
7	18.06	1342	delta-Elemene	C15H24	0.17	0.78	
8	19.19	1382	Geranyl acetate	C12H20O2	0.39	1.55	

9	19.57	1395	beta-Cubebene	C15H24	0.24		
10	19.53	1394	beta.-Elemene	C15H24		0.98	
11	20.41	1427	beta-Caryophyllene	C15H24	0.39	1.55	
12	21.14	1456	Nerolidol	C15H26O		0.39	
13	21.27	1461	alpha-Humulene	C15H24		0.43	
14	22.04	1489	Germacrene-D	C15H24	1.14	3.79	
15	22.40	1502	Bicyclogermacrene	C15H24		0.34	
16	22.60	1511	2,4-Di-tert-butylphenol	C15H22O		0.26	0.4
17	23.06	1530	delta-Cadinene	C15H24	0.19	0.77	
18	23.66	1554	Elemol	C15H26O		0.45	
19	27.16	1699	beta-Sinensal	C15H22O		0.24	
20	28.43	1756	Alpha-Sinensal	C15H22O		0.42	
21	32.78	1960	Hexadecanoic acid	C16H32O2	0.61		4.32
22	35.14	2079	Xanthotoxin	C12H8O4	0.33	1.18	0.3
23	35.35	2090	Henicosane	C21 H44			0.47
24	35.77	2112	Phytol	C20H40O	1.03	0.23	
25	36.23	2137	Ethyl linoleate	C20H36O2			4.75
26	36.36	2144	Octadecanoic acid	C18H36O2			3.69
27	36.56	2155	Osthol	C15H16O3	0.25	0.95	
28	37.22	2189	Docosane	C22H46			0.98
29	38.45	2259	7-Methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl)coumarin	C15H16O4	2.28	1.28	
30	38.67	2271	1,1,4,4-Tetramethyl-2-tetralone	C14H18O		17.84	
31	39.06	2293	Tricosane	C23H48	1.03		7.07
32	39.25	2304	7-Methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl)coumarin	C15H16O4		0.87	
33	40.08	2354	2-Methyltricosane	C24H52			1.14
34	40.27	2365	9-Butyldocosane	C26H54			3.77
35	40.70	2390	Tetracosane	C24H50			3.05
36	41.68	2455	Methyl-tetracosane	C25H50			5.99
37	42.25	2493	pentacosane	C25H52	1.19		8.24
38	43.24	2568	Methylpentacosane	C26H52	0.66		
39	43.58	2593	Hexacosane	C26H54	0.16		1.30
40	44.29	2652	Auraptene	C19H22O3	0.65	3.66	0.96
41	44.32	2654	8-Methylhexacosane	C27H54			2.07
42	44.8	2693	Heptacosane	C27H56	0.2		2.03
43	46.35	2829	Squalene	C30H50	0.26		0.78
44	47.88	3000	Triacontane	C30H62			0.21
45	48.78	3000<	gamma.-Tocopherol	C28H48O2		1.00	
46	49.78	3000<	alpha-tocopherol	C28H48O2	0.68	4.41	
47	50.71	3000<	4',5,6,7,8-Pentamethoxyflavone	C20H20O7	1.06	2.8	0.66
48	51.38	3000<	delta.5-Ergosterol	C28H48O	0.79	2.03	3.02
49	52.73	3000<	gamma-Sitosterol	C29H48O	3.37	1.96	1.22

50	52.69	3000<	gamma-Sitosterol	C29H50O		8.11	11.38
51	53.09	3000<	3,3',4',5,5',7,8-Heptamethoxyflavone	C22H24O9	0.7	2.4	0.87
52	53.43	3000<	3',4',5,6,7,8-Hexamethoxyflavone	C21H22O8	0.7	1.48	0.66
Total					90.4	90.72	71.06

- Terpene이 주된 성분으로 나타났으며, aldehyde, alcohol, coumarin, polymethoxy flavonoids들로 분류되는 화합물이 미성숙 당유자 추출물에서 발견되었다 (Fig. 33).

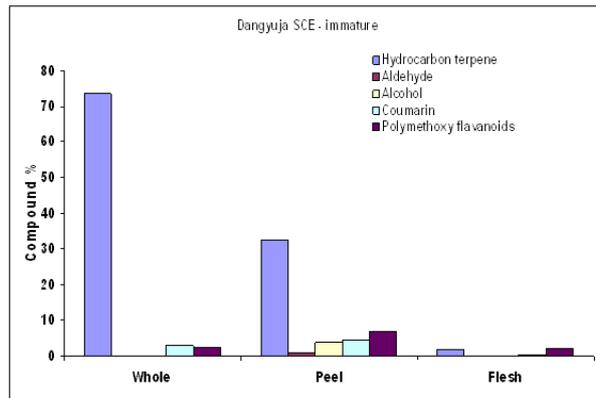


Figure. 33. Relative content of functional groups of volatile organic compounds identified in supercritical extract of immature Danguyuja.

- 1,1,4,4-Tetramethyl-2-tetralone는 오직 과피에서만 발견되었으며, Limonene과 beta-Myrcene 두 화합물이 70% 이상을 차지함을 알 수 있다. 하지만 과피에서 발견된 몇몇 화합물들이 통과에서 검출되지 않는 것은 시료의 variation 때문으로 사료된다 (Fig. 34).

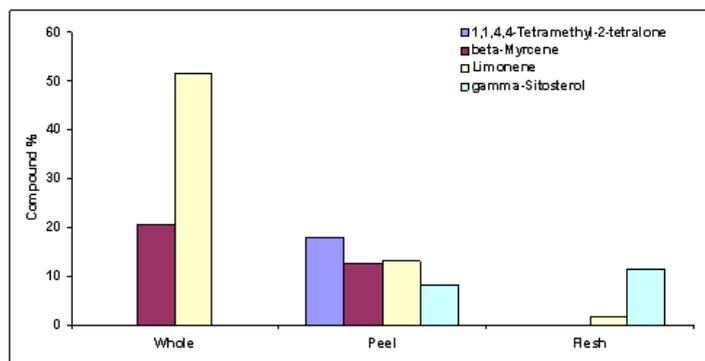


Figure. 34. Relative proportion of major four constituents in supercritical extract of immature Danguyuja.

나. 미성숙 팔삭 초임계 추출물 성분분석

- 미성숙 팔삭 통과, 과육, 과피를 초임계 추출방법을 통하여 준비하고 GC/MS을 통하여

분석하였다. 휘발성 유기 화합물은 Table 14에 표현하였으며, 크로마토그래피는 Fig. 35를 통하여 나타내었다.

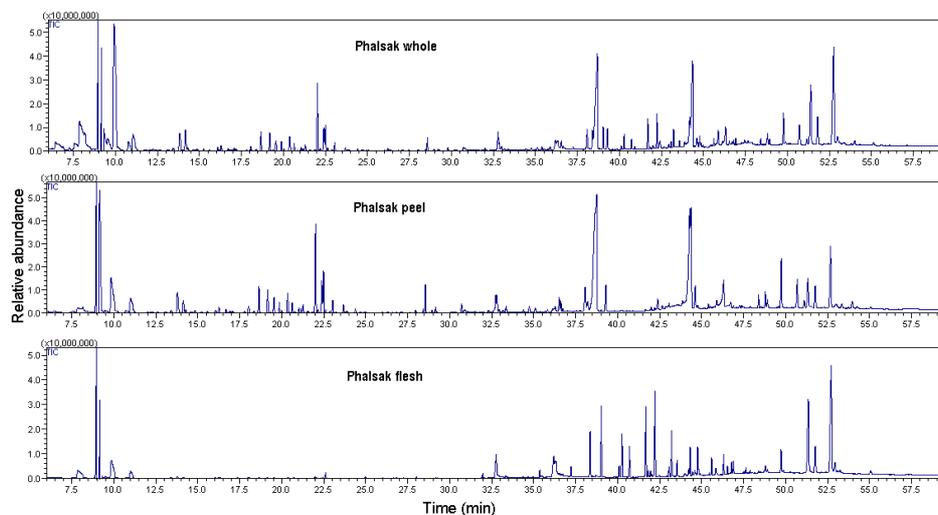


Figure. 35. GC-MS chromatogram of supercritical extract of immature Phalsak varieties from Jeju, Korea.

Table 14. Chemical compounds identified from supercritical extract of fruit of immature Phalsak variety.

SN	RT	Report	Name	MF	Area %		
					Whole	Peel	Flesh
1	7.87	994	beta-Myrcene	C10H16	0.72		
2	8.86	1030	Sylvestrene	C10H16	1.00	4.24	
3	9.12	1039	Limonene	C10H16	3.97	7.98	8.03
4	9.75	1061	gamma-Terpinene	C10H16	19.00	4.86	3.28
5	10.92	1098	Linalool	C10H18O	1.43	1.79	1.48
6	11.14	1106	Nonanal	C9H20O	0.62		
7	13.71	1191	alpha-Terpineol	C10H18O		1.61	
8	14.07	1201	Decanal	C10H20O	1.38	0.72	
9	18.58	1361	Neryl acetate	C12H20O2	0.85	1.05	
10	19.09	1378	Geranyl acetate	C12H20O2	0.93	1.09	
11	19.46	1391	Beta-Elemene	C15H24	0.64	0.88	
12	19.80	1403	Decyl acetate	C15H24		0.4	
13	21.93	1485	Germacrene-D	C15H24	3.35	4.17	
14	22.31	1498	alpha-Selinene	C15H22O	1.28	1.67	
15	22.44	1504	Farnesene	C15H24		1.77	
16	22.61	1511	2,4-Di-tert-butylphenol	C14H22O			0.35
17	22.97	1526	delta-Cadinene	C15H24	0.32	0.46	
18	23.62	1552	Elemol	C15H26O		0.31	
19	29.12	1786	Ethyl myristate	C16H32O2		0.2	
20	31.97	1919	Methyl palmitate	C17H34O2			0.27

21	33.30	1984	Ethyl palmitate	C18H36O2		0.26	
22	36.20	2135	Ethyl linoleate	C20H36O2			2.80
23	36.28	2139	Octadecanoic acid	C18H36O2			1.17
24	36.45	2148	Osthol	C15H16O3	0.31	0.66	
25	37.22	2189	Docosane	C22H46			0.65
26	37.96	2231	7-Methoxy-8-(2-formyl-2-methylpropyl)coumarin	C15H16O4	1.28	1.68	
27	38.13	2241	Xanthoxol	C11H6O4		0.84	
28	38.31	2251	1,1,4,4-Tetramethyl-2-tetralone	C14H18O		20.86	
29	38.36	2253	Methyl docosane	C23H49			3.42
30	38.69	2272	4-Methyl-3-propyl-2H-1-benzopyran-2-one	C13H19O2	13.45		
31	39.02	2291	Tricosane	C23H48	1.05		5.37
32	39.20	2300	7-Methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl)coumarin	C15H16O	1.23	1.37	
33	40.09	2354	2-Methyltricosane	C24H52			0.79
34	40.27	2364	9-Butyldocosane	C26H54			3.05
35	40.70	2390	Tetracosane	C24H50	0.45		2.08
36	41.67	2454	Methyltetracosane	C25H54			4.82
37	42.22	2491	Pentacosane	C25H52	1.39		5.94
38	43.21	2565	3-Methylpentacosane	C26H54			2.83
39	43.54	2590	Hexacosane	C26H54			0.98
40	44.08	2633	Alloimperatorin	C16H14O4		8.15	
41	44.31	2653	Auraptene	C19H22O3	7.81	7.29	0.54
42	44.32	2653	8-Methylhexacosane	C27H54			1.73
43	44.76	2690	Heptacosane	C27H56			2.14
44	45.59	2798	Octacosane	C28H58			1.03
45	46.30	2829	Squalene	C30H50	1.21		1.26
46	47.63	3000	Triacotane	C30H62			0.28
47	48.70	3000<	.gamma.-Tocopherol	C28H48O2	0.41	0.73	
48	49.64	3000<	alpha-tocopherol	C28H48O2	1.67	2.41	0.86
49	50.57	3000<	4',5,6,7,8-Pentamethoxyflavone	C20H20O7	1.32	1.78	
50	51.20	3000<	delta.5-Ergosterol	C28H48O	4.84	1.87	9.6
51	51.64	3000<	Stigmasterol	C29H48O	1.89	1.34	2.71
52	52.52	3000<	gamma-Sitosterol	C29H50O	9.26	4.38	16.65
53	53.26	3000<	3',4',5,6,7,8-Hexamethoxyflavone	C21H22O8	0.56	0.24	
				Total	83.62	87.06	84.11

- 53가지의 물질이 미성숙 팔삭 초임계 추출물에서 분리되었으며, hydrocarbon terpenoid 과 coumarin이 주된 성분으로 나타났으며, alcohol, phytosteroids, polymethoxy flavonoids들로 분류되는 화합물이 팔삭 추출물에서 발견되었다 (Fig. 36).

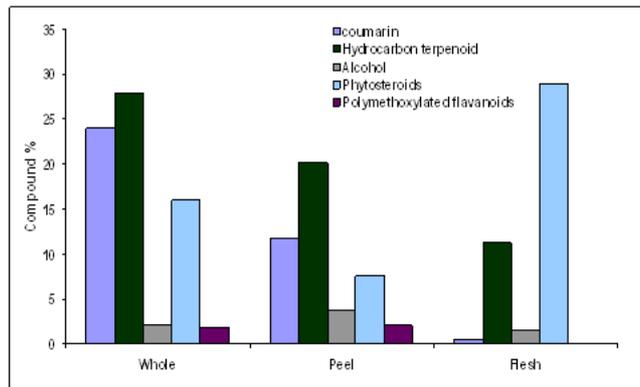


Figure. 36. Relative content of functional groups of volatile organic compounds identified in supercritical extract of immature Phalsak.

- 팔삭 추출물에서도 limonene의 함량이 크며 gamma-Sitosterol 또한 차지하고 있는 비중이 크다. 하지만 팔삭 과피에 많이 함유되어 있는 auraptene이 미성숙 팔삭 초임계 추출물에서의 항암 효능에 대한 후보 물질로 생각되어지며 다른 화합물과의 차이점이기에 매우 흥미롭다고 여겨진다 (Fig. 37).

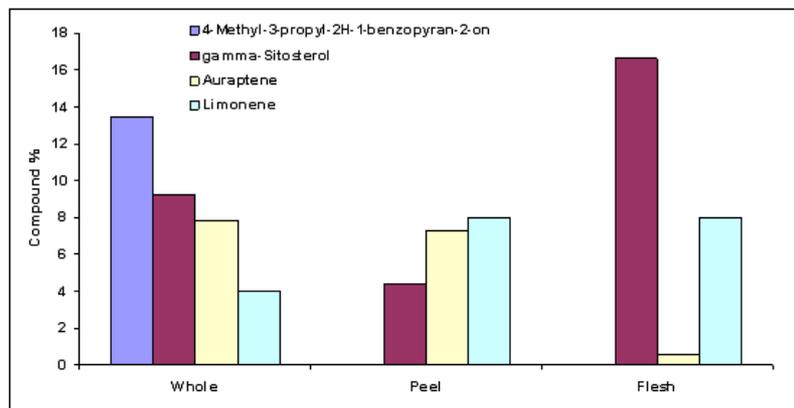


Figure. 37. Relative proportion of major four constituents in supercritical extract of immature Phalsak.

다. 미성숙 이예감 초임계 추출물 성분분석

- 미성숙 이예감 추출물도 초임계 추출법을 이용하여 준비하였으며, GC/MS로 분석하였다. 검출된 화합물의 목록은 Table 15로 표현하였으며, 크로마토그래피는 Fig. 38로 나타내었다.
- 미성숙 이예감 초임계 추출물에서 49가지의 화합물이 분리되었으며, 과피는 hydrocarbon terpene이 주된 부류였고, 과육에서는 alkane이 주요 그룹임을 확인하였다. 그 외에 alcohol, aldehyde, fatty acids, polymethoxy flavonoids 등으로 분류되었다 (Fig. 38).

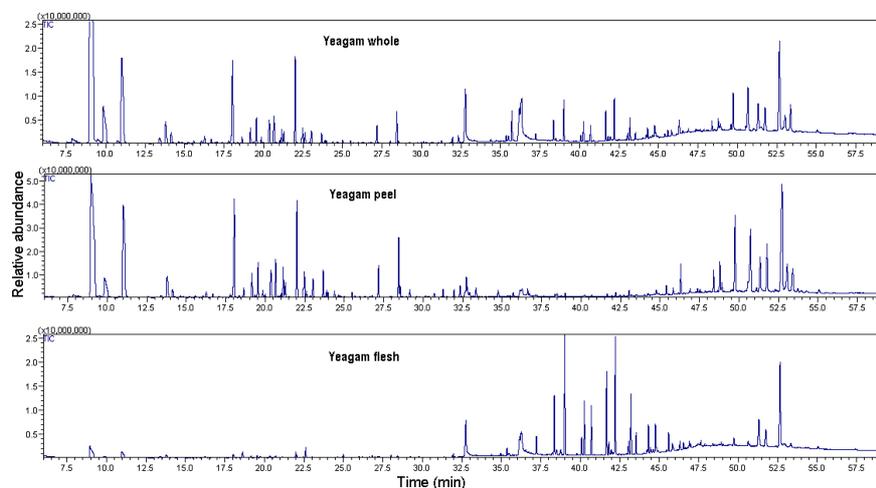


Figure. 38. GC-MS chromatogram of supercritical extract of immature Yeagam varieties from Jeju, Korea.

Table 15. Chemical compounds identified from supercritical extract of fruit of immature Yeagam variety.

SN	RT	RI	Name	FF	Area %		
					Whole	Peel	Flesh
1	8.97	1034	Limonene	C10H16	37.6	22.19	3.6
2	9.83	1064	gamma-Terpinene	C10H16	4.50		
3	11.00	1101	Linalool	C10H18O	8.78	11.23	1.42
4	13.78	1193	alpha-Terpineol	C10H18O	1.42	1.60	
5	14.13	1204	Decanal	C10H20O	0.56	0.48	
6	16.26	1278	Perillal	C10H14O		0.29	
7	18.04	1341	delta-Elemene	C15H24	3.21	5.02	0.31
8	18.62	1362	Limonene oxide	C10H16O			0.53
9	18.64	1363	Neryl acetate	C12H20O2		0.38	
10	19.16	1381	Geranyl acetate	C12H20O2	0.61	1.13	
11	19.55	1394	beta-Elemene	C15H24	0.95	1.55	
12	20.36	1426	beta-Caryophyllen	C15H24	1.12	1.61	
13	21.14	1456	Nerolidol	C15H26O		1.17	
14	21.28	1461	alpha-Humulene	C15H24	0.46	0.72	
15	22.01	1488	Germacrene-D	C15H24	3.1	4.46	0.44
16	22.40	1502	bicyclogermacrene	C15H24		0.35	
17	22.61	1511	2,4-Di-tert-butylphenol	C14H22O	0.37		0.77
18	23.02	1528	delta-Cadinene	C15H24	0.49	0.92	
19	23.67	1555	Elemol	C15H26O	0.33	1.06	
20	23.88	1563	Nerolidol	C15H26O		0.24	
21	24.98	1606	4-(2,2,3,3-tetramethylbutyl)-pheno l	C14H22O			0.27
22	27.17	1699	beta-Sinensal	C15H22O	0.56	1.31	

23	28.45	1757	alpha-Sinensal	C15H22O	1.09	2.66	
24	29.16	1788	Ethyl myristate	C16H32O2		0.29	
25	31.97	1919	Methyl palmitate	C17H34O2			0.22
26	32.78	1960	Hexadecanoic acid	C16H32O2	2.8		4.21
27	33.34	1987	Ethyl palmitate	C18H36O2		0.36	
28	35.36	2098	Heneicosane	C21H44			0.62
29	35.71	2108	Phytol	C20H40O	1.07		
30	36.16	2133	Ethyl linoleate	C20H36O2			2.52
31	36.25	2138	Octadecanoic acid	C18H36O2			2.58
32	37.22	2189	Docosane	C22H46			1.52
33	38.35	2253	3-Methyl docosane	C23H49			4.89
34	39.05	2298	Tricosane	C23H48	1.39		12.10
35	40.69	2389	Tetracosane	C24H50	0.51		3.89
36	41.66	2454	2-Methyltetracosane	C25H52			6.59
37	41.96	2474	Pentacosanol	C15H32O			0.44
38	42.19	2490	Pentacosane	C25H52	1.25		9.11
39	43.53	2589	Hexacosane	C26H54			1.46
40	44.75	2699	Heptacosane	C27H56	0.35		2.51
41	46.30	2790	Squalene	C30H50	0.51	1.19	0.67
42	48.78	3000<	gamma.-Tocopherol	C28H48O2	0.4	1.33	
43	49.75	3000<	alpha-Tocopherol	C28H48O2	1.41	4.24	
44	50.73	3000<	4',5,6,7,8-Pentamethoxyflavone	C20H20O7	2.3	4.68	0.5
45	51.34	3000<	delta.5-Ergosterol	C28H48O	1.38	2.18	5.54
46	51.78	3000<	Stigmasterol	C29H48O	1.16	2.86	2.05
47	52.73	3000<	Gamma-Sitosterol	C29H50O	5.4	9.12	11.72
48	53.02	3000<	3,3',4',5,5',7,8-Heptamethoxyflavone	C22H24O9	0.64		
49	53.40	3000<	3',4',5,6,7,8-Hexamethoxyflavone	C21H22O8	1.42	1.59	0.3
				Total	87.14	86.21	80.78

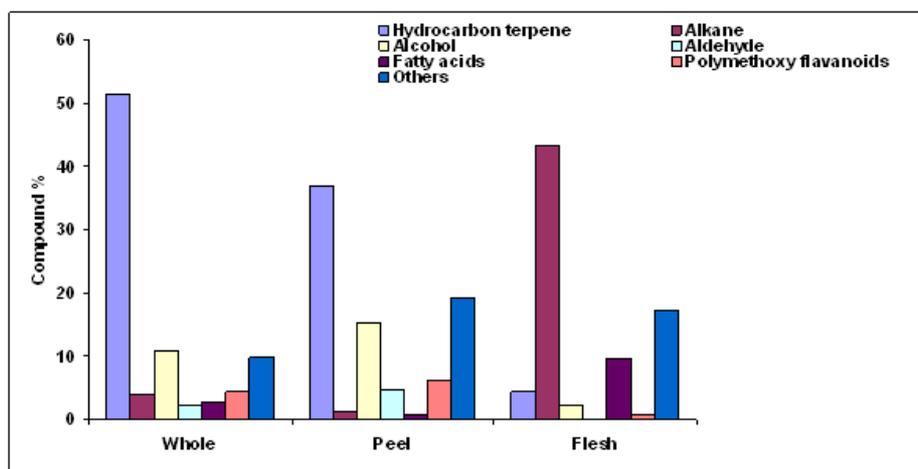


Figure. 39. Relative content of functional groups of volatile organic compounds identified in supercritical extract of immature Yeagam.

- 미성숙 이예감 초임계 추출물에서 Limonene과 Linalool이 과피에서의 주된 화합물로 분리되었으며, 과육에서는 상대적으로 gamma-Sitosterol이 많은 함량을 차지하고 있었다 (Fig. 40).

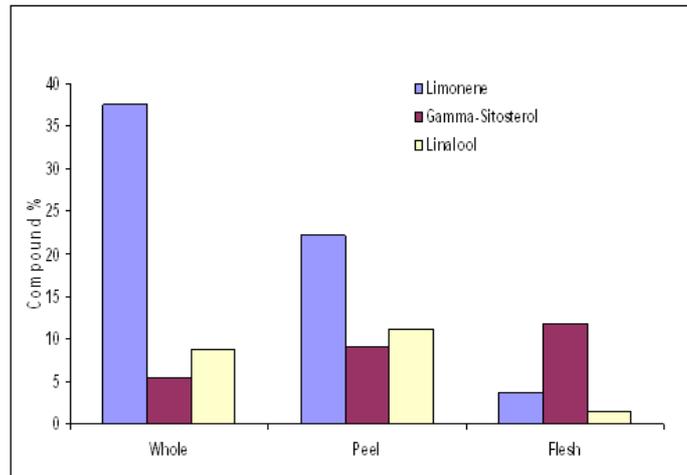


Figure. 40. Relative proportion of major five constituents in supercritical extract of immature Yeagam.

제 3절 재래감귤의 다양한 추출물에 대한 대식세포의 세포독성 측정

1. 재래감귤의 다양한 추출물에 대한 대식세포의 세포독성 측정

- 대식세포인 RAW264.7 세포에서 이에감, 팔삭, 당유자의 과육, 과피, 통과 추출물을 처리한 결과, 이에감에서는 20 ug/mL까지는 세포독성을 보이지 않았고 팔삭에서도 20 ug/mL까지는 낮은 세포독성을 보였다. 마지막으로 당유자 다른 재래감과 비교했을 때 약간 더 세포독성을 보였으나 20 ug/mL까지는 낮은 세포독성을 보였다. 이에 본연구자는 재래감의 세포독성이 20 ug/mL까지는 거의 없는 것으로 판단하여 나머지 소염효과를 보기위하여 한 농도로 고정하여 NO 에세이를 수행할 것이다 (Fig. 41).

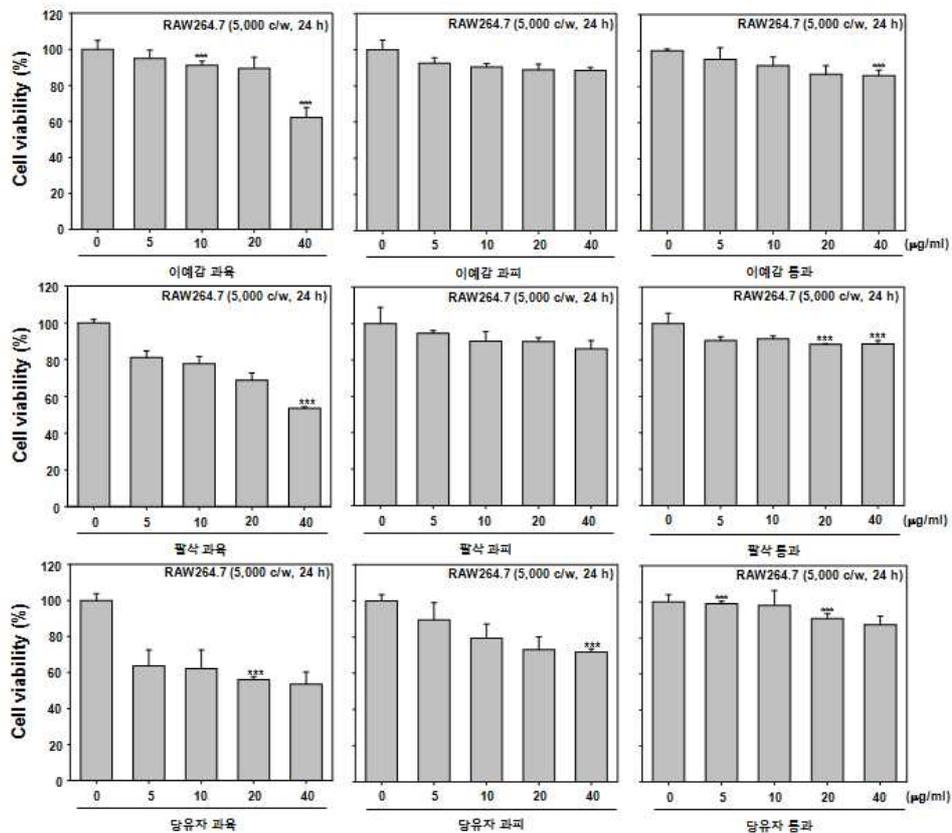


Figure. 41. Effects of fraction from various Citrus on the cell viability in RAW 264.7 macrophages.

2. 재래감귤의 과피 추출물에 대한 LPS로 유도된 산화질소 억제능 평가

- RAW264.7 대식세포에서 이에감, 팔삭, 당유자의 과육, 과피, 통과 추출물을 20 ug/mL 처리한 후 lipopolysaccharide (LPS)로 산화질소의 발생을 유도하였을 때 이에감 과피와, 팔삭 과피 추출물을 처리한 부분에서 LPS로 유도된 산화질소의 생성이 억제되는 것을 확인하였다. 대식세포에서는 LPS를 외부 침입자로 간주하여, 이에 대해 독성을 갖는 방어물질인 산화질소를 iNOS을 통하여 발생하게 되는데, 이산화질소의 억제는 항염증효과를 보이는 것으로

판단할 수 있다 (Fig. 42).

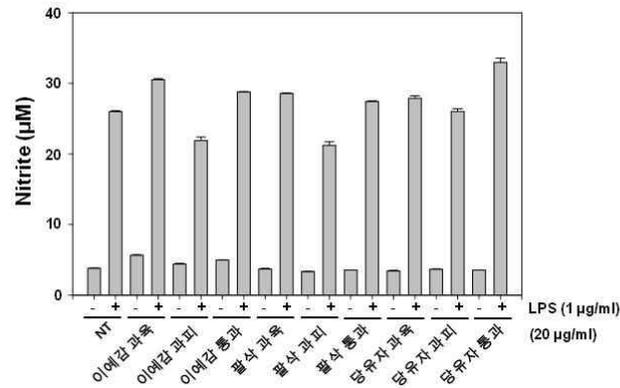


Figure. 42. Effects of fraction from various Citrus on the LPS induced nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophages.

3. 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물의 항염증효능 평가

가. 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물의 산화질소 억제능 평가

- 대식세포인 RAW264.7 세포에서 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물을 0-40 ug/ml 농도별로 처리한 결과 LPS로 유도된 산화질소의 생성이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 43A and B).

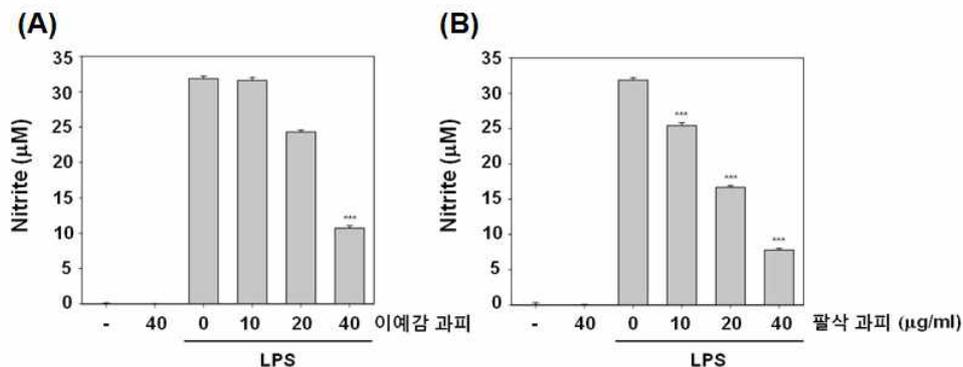


Figure. 43. Effects of fraction from Iyokan and hassaku pericarp on the LPS induced nitric oxide (NO) in RAW 264.7 macrophages.

나. 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물에 의한 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 유전자 발현 억제 평가

- RAW264.7 대식세포에서 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물이 iNOS, COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 웨스턴블랏을 하였다. LPS로 유도된 마크로파아지는 염증을 일으키게 되며, 이 물질에 의해해 염증 유발 단백질로 알려진 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 증가하게 된다. LPS로 자극하지 않은 부분에서는 iNOS와 COX-2의 발현이 되지 않았으나, 이예감 과피와 팔삭 과피를 0-40 ug/mL 농도별로 처리한 후 LPS로 iNOS와 COX-2를 유도하였을 때, iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 44A and B).

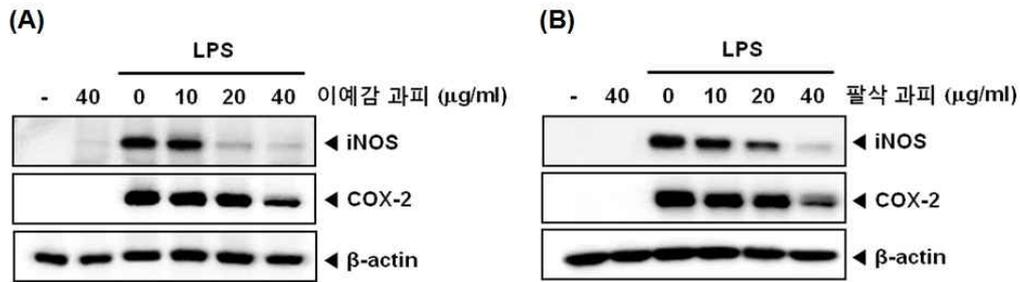


Figure. 44. Inhibition of the fraction from Iyokan and hassaku pericarp on LPS induced iNOS, COX-2 gene products in RAW 264.7 macrophages (A) 이예감 과피. (B) 팔삭 과피.

다. 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물에 의한 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 억제 능력 평가

- 위에서 수행하였던 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 mRNA의 발현 수준과 관련이 있는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. LPS로 자극하지 않은 부분에서는 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 되지 않았으나, 이예감 과피와 팔삭 과피를 0-40 ug/mL 농도별로 처리한 후 LPS로 iNOS와 COX-2를 유도하였을 때, mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 45A and B).

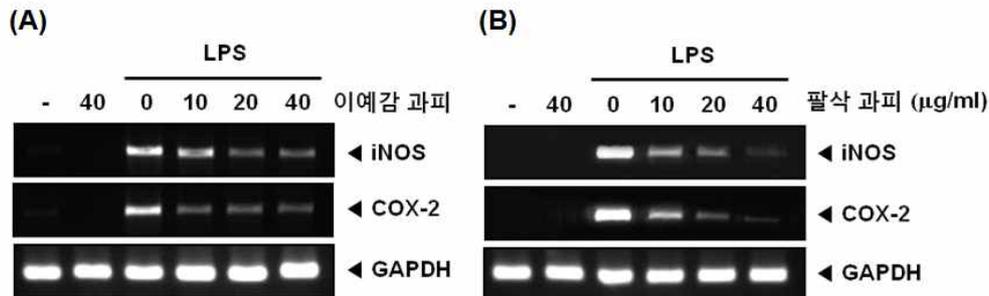


Figure. 45. Inhibition of iNOS and COX-2 mRNA expressions by fraction from Iyokan and hassaku pericarp in LPS-stimulated RAW264.7 cells (A) 이예감 과피. (B) 팔삭 과피.

라. 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물에 의한 LPS로 유도된 NF-κB의 활성화 억제 효과 확인

- 염증에 중요한 전사인자인 NF-kappaB는 염증반응에 있어서 iNOS와 COX-2을 조절하므로써 염증 반응을 매개한다고 잘 보고되었다. 이에 본 실험에서는 NF-kappaB의 Subunit인 p65의 인산화 정도를 평가하였다. 그 결과 LPS에 의한 p65의 인산화는 15분에서 극도로 인산화 되어지며 팔삭 과피를 전 처리한 세포군에서는 이 p65의 인산화가 억제됨을 보였다. 따라서 팔삭 과피는 LPS에 유도되는 NF-kappaB의 활성을 억제하고 결과적으로 iNOS와 COX-2을 발현을 억제하는 것으로 판단된다 (Fig. 46).

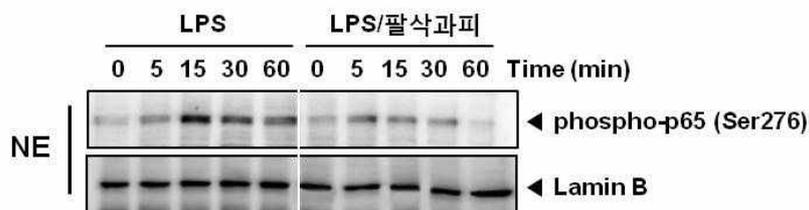


Figure. 46. Suppression of LPS induced NF- κ B activity by fraction from Citrus hassaku pericarp in RAW 264.7 macrophages.

- 마. 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물에 의한 LPS로 유도된 p38, ERK1/2, JNK의 인산화 반응 억제능 평가
- 또 다른 염증인자 카이네아제인 MAPKs (p38, ERK, JNK)에 대한 인산화 정도가 억제되는가를 평가를 하였다. 이 결과 팔삭 과피는 LPS에 유도되는 어떠한 MAPKs (p38, ERK, JNK) 인산화를 억제됨을 확인 할 수가 없었다. 위의 결과로 팔삭 과피의 소염효과는 MAPKs (p38, ERK, JNK)의 인산화 억제를 통해서 일어나는 것이 아니라 NF-kappaB의 활성억제를 통해서 일어난다는 것을 다시 한 번 확인해 주었다 (Fig. 47).

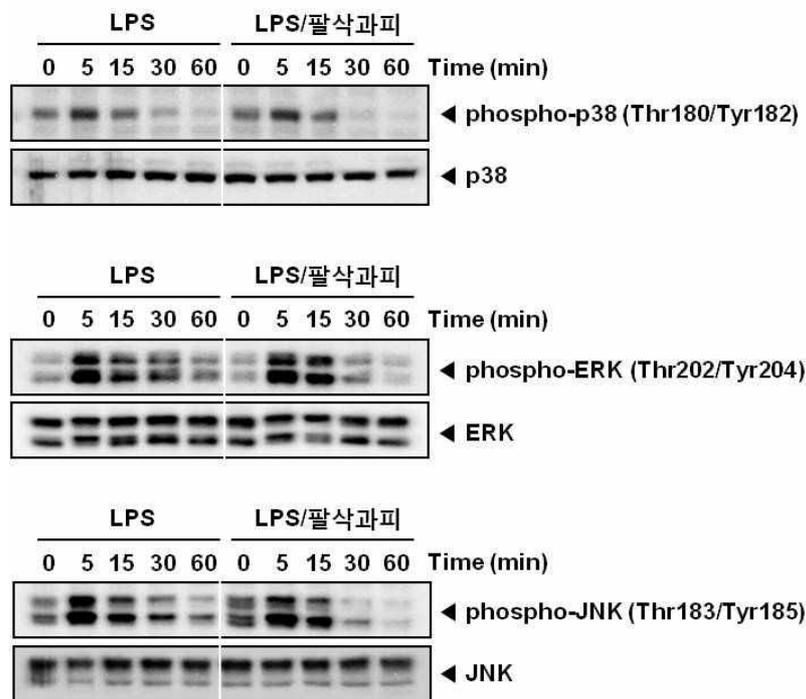


Figure. 47. Effects of fraction from Citrus hassaku pericarp on LPS induced activation of p38, ERK, and JNK.

- 바. 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물에 의한 LPS로 유도된 IL-6와 TNF α 생성량 억제 효과 확인
- NF- κ B 활성화에 의해서 IL-6와 TNF α 가 조절이 된다는 것은 잘 알려져 오고 있다. 이에 본 실험에서는 RAW264.7 대식세포에서 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물이 LPS에 의한 IL-6와 TNF α 배지에 유리된 억제능을 확인하기 위하여 ELISA 방법을 이용하였다. 우선, LPS만을 처리한 세포군에서는 상당한 량의 IL-6와 TNF α 배지로 분비되는 것을 확인하였고 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물을 전처리한 세포군에서는 농도의존적으로 IL-6와 TNF α 량이 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 이예감 과피, 팔삭 과피 추출물이 염증성 사이토카인인 IL-6와 TNF α 량을 저해함으로써 항염증 효능을 가진다는 것을 확인하였다 (Fig. 48).

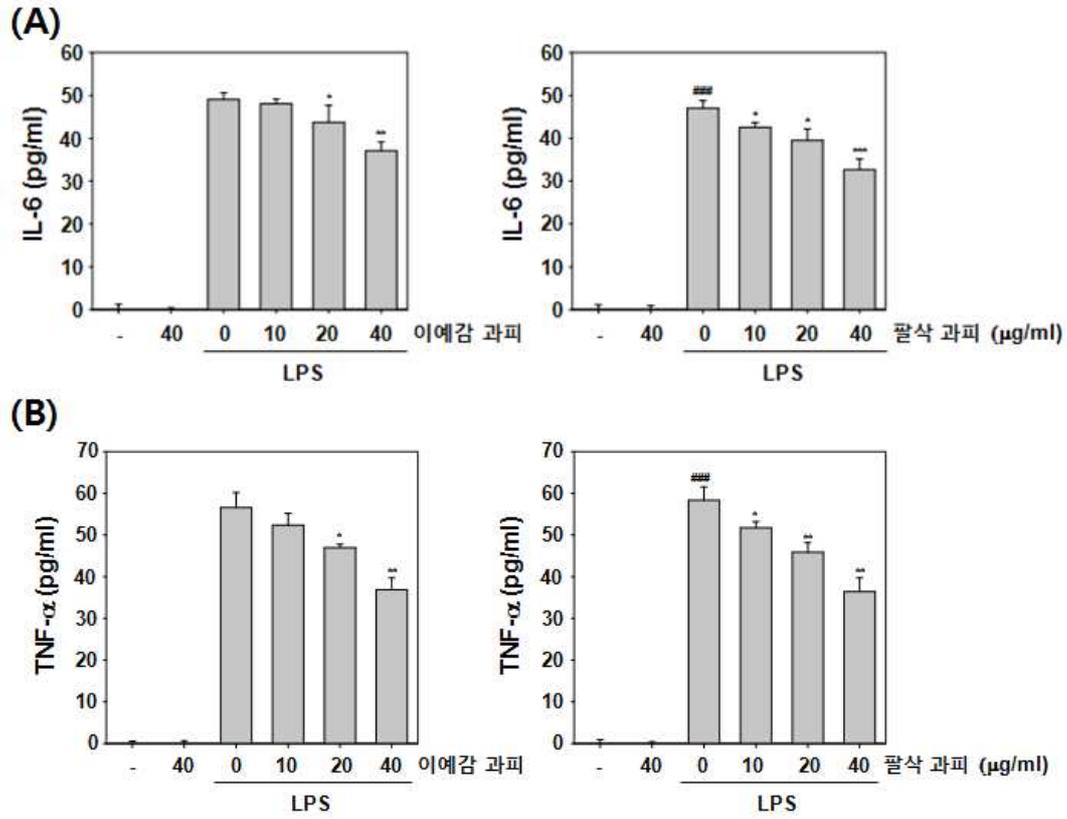


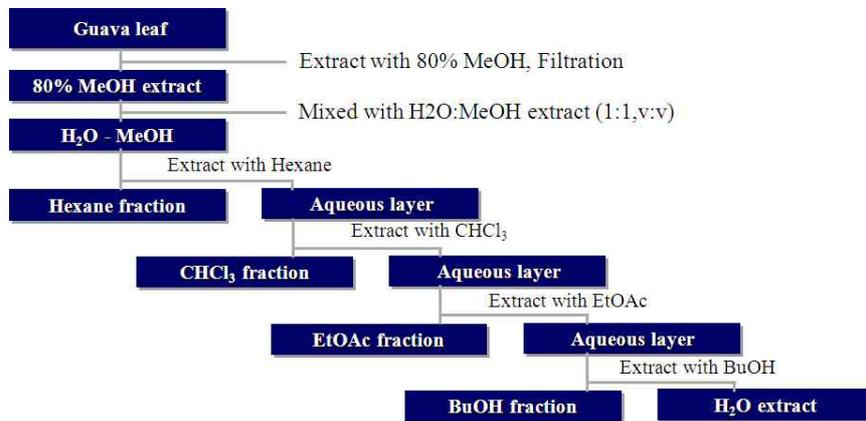
Figure. 48. Inhibition of the fraction from Iyokan and hassaku pericarp on LPS induced IL-6 and TNF α production in RAW 264.7 macrophages.

제 4절 부재료로 사용된 구아바 잎 EtOAc 분획물과 인진쑥 추출물에서 분리된 Capillarisin에 의한 생리활성기작 탐색

1. 구아바 잎 EtOAc 분획물에 의한 HepG2 세포에서의 세포 보호 효능 탐색

가. 구아바 잎 추출물 확보

- 건조된 구아바 잎 1200 g을 분쇄하여 80% 메탄올로 3일간 추출한 뒤 감압 농축기를 이용하여 27.0 g의 메탄올 추출물을 얻을 수 있었다. 이 메탄올 추출물 20.0 g을 계통적 추출 방법 (Schem. 1)을 이용하여 에틸아세테이트 분획물 (EAF) 0.8 g을 얻을 수 있었다.



Scheme 1. Fractionation of guava leaf extraction.

나. 구아바 잎 분획물들에 대한 항산화 효능 비교 탐색

- 구아바 잎 분획물들에 대한 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정하였다 (Table. 16). 그 결과 에틸아세테이트 분획물 (EAF)과 부탄올 분획물 (BF)에서 다른 분획물에 비해 높은 함량을 나타내었다.

Table 16. Total phenolic content and total flavonoid content from different fraction of *P. cattleianum* leaf extract.

Sample	Total polyphenol content (mg/g)		Total flavonoid content (mg/g)	
	Gallic acid		Rutin	
HF	157.22±16.58		114.35±8.76	
CF	166.10±17.14		193.74±3.65	
EAF	318.33±44.06		330.92±14.89	
BF	326.92±38.81		443.57±22.90	
WF	227.28±29.29		322.74±12.26	
ME	275.40±29.55		329.75±10.65	

- 전자스핀공명분광기 (Electron Spin Resonance Spectrometer)를 이용한 구아바 잎 분

획물들의 자유라디칼 소거능을 측정 한 결과, EAF와 BF가 가장 좋은 활성을 나타내었다 (Fig. 49).

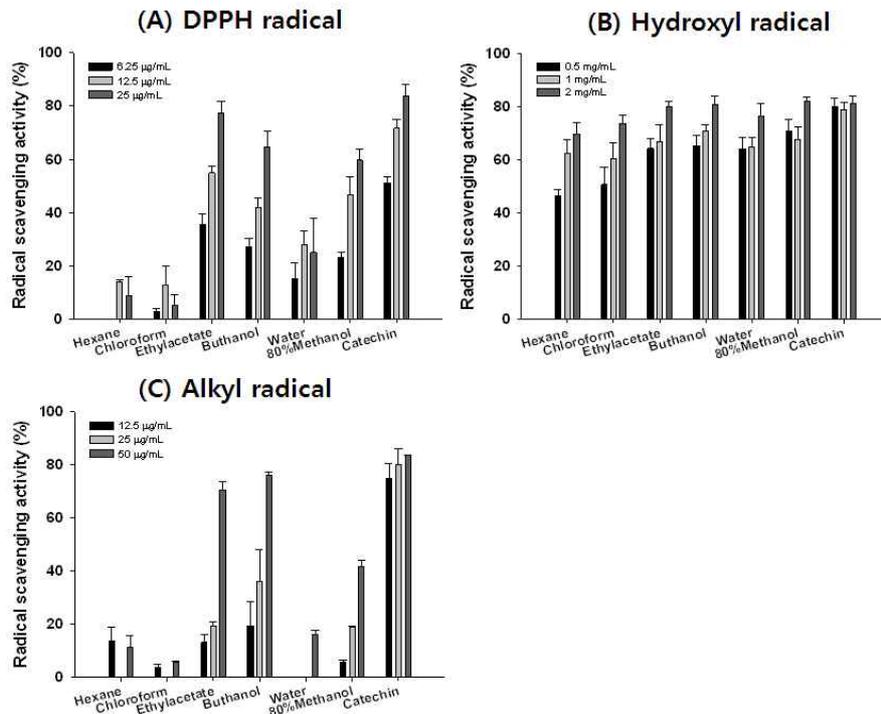


Figure. 49 Radical scavenging activity of various fractions of *P. cattleianum* leaf extract. (A) DPPH, (B) hydroxyl, and (C) alkyl radical. All fractions were added at 6.25 - 25 $\mu\text{g/mL}$ (A, C), 0.5 - 2 mg/mL (B). Catechin was used positive control. Values are means \pm SD (n =3).

다. 산화 스트레스에 의해 유도된 DNA damage에 대한 구아바 잎 분획물들의 세포 보호 효능 탐색

- 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높았으며, 자유라디칼 소거능 활성이 뛰어난 EAF와 BF를 HepG2 세포에 1시간 전 처리한 뒤, H_2O_2 를 4시간 처리하여 산화스트레스를 유도하였다. 4 시간 뒤 MTT를 처리하여 세포 생존율을 확인 한 결과, EAF만이 H_2O_2 에 대한 산화스트레스를 보호하는 것으로 나타났으며 (Fig 50A), EAF를 농도별로 전 처리한 뒤, H_2O_2 를 처리한 결과 농도 의존적으로 산화스트레스에 대한 보호 효과가 나타났다 (Fig. 50B).

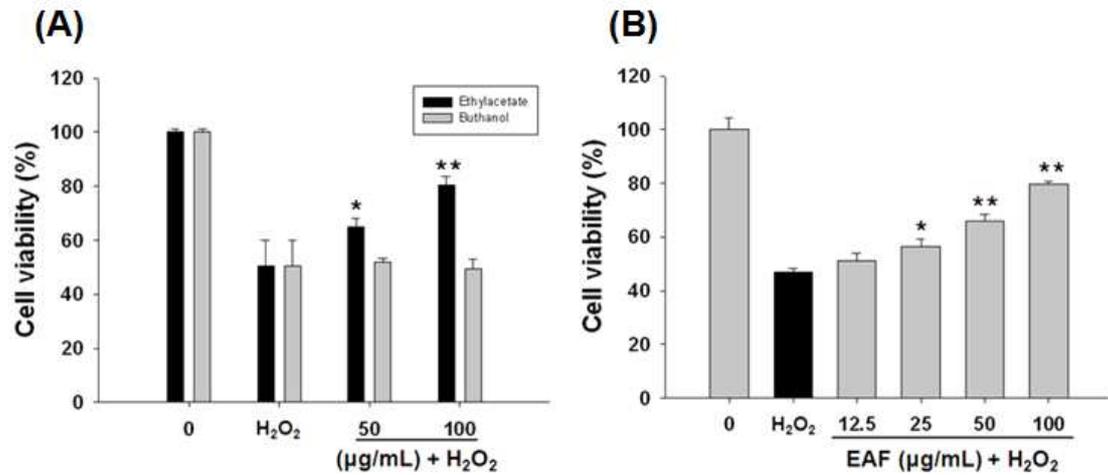


Figure. 50. Protective effects of EAF of *P. cattleianum* leaf. (A) HepG2 cell culture were treated for 1 h with 50 and 100 µg/mL concentrations of ethyl acetate fraction (EAF) and butanol fraction (BF) and then incubated with 200 µM of H₂O₂ for 4 h. (B) Cell treated with various concentration of EAF. The values presented are the means ± SD (n =4).

- Comet assay를 통하여 H₂O₂에 의한 DNA damage를 확인 할 수 있으며, 위와 같은 조건으로 EAF를 농도별로 전 처리한 뒤 H₂O₂를 4 시간 처리한 뒤, 세포를 슬라이드에 low-melting point agarose (LMPA)로 고정 한 뒤 세포벽을 lysis 한 뒤 DNA 전기영동을 통해 부서진 DNA 조각들의 이동을 통하여 DNA damage를 측정하였다. 그 결과, EAF 농도 의존적으로 H₂O₂에 의한 DNA damage가 줄어드는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 51).

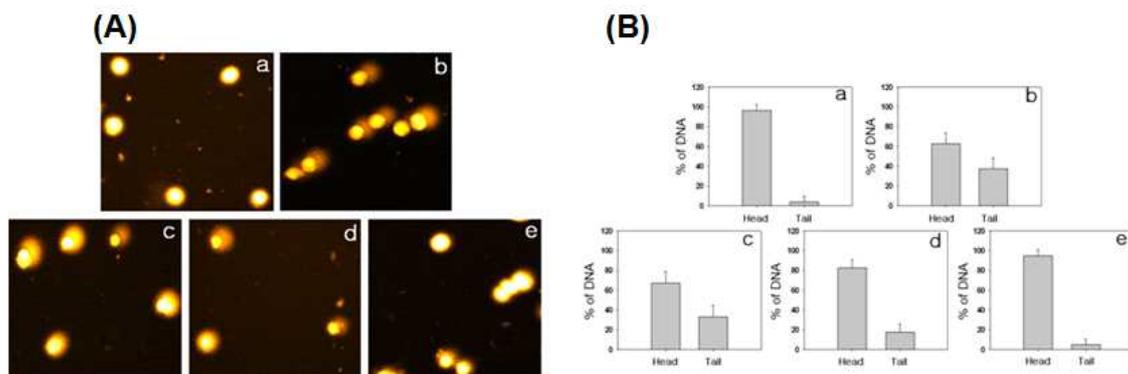


Figure. 51. Protective effects of EAF on H₂O₂-induced DNA damage by comet assay. (A) HepG2 cells were pretreated with the 25 - 100 µg/mL of EAF for 1 h prior to the incubation with 200 µM of H₂O₂ for 4 h. (B) Graphical representation of comet assay. (a) Control. (b) 200 µM H₂O₂. (c) 25 µg/mL EAF+H₂O₂. (d) 50 µg/mL EAF+H₂O₂. (e) 100 µg/mL EAF+H₂O₂.

2. 인진쪽으로부터 분리된 Capillarisin의 항염증 효능 탐색 및 항암 기전 구명

가. 동물세포계(*in vitro*)를 이용한 Capillarisin의 항염증효능

(1) Capillarisin의 산화질소 억제능 평가 (Nitric Oxide Assay)

- RAW264.7 대식세포에서 Capillarisin을 4, 16, 80, 160 uM의 농도로 처리한 후 lipopolysaccharide (LPS)로 산화질소의 발생을 유도하였을 때 LPS로 유도된 산화질소의 생성이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 대식세포에서는 LPS를 외부 침입자로 간주하여, 이에 대해 독성을 갖는 방어물질인 산화질소를 iNOS를 통하여 발생하게 되는데, 이 산화질소의 억제는 항염증효과를 보이는 것으로 판단할 수 있다.
- RAW264.7 대식세포에서 Capillarisin이 iNOS, COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 웨스턴블랏을 하였다. LPS로 유도된 매크로파아지는 염증을 일으키게 되며, 이 물질에 의해 염증 유발 단백질로 알려진 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 증가하게 된다. LPS로 자극하지 않은 부분에서는 iNOS와 COX-2의 발현이 되지 않았으나, Capillarisin을 4, 16, 80, 160 uM 농도별로 처리한 후 LPS로 iNOS와 COX-2를 유도하였을 때, iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 52A).
- 위에서 수행하였던 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 mRNA의 발현 수준과 관련이 있는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. LPS로 자극하지 않은 부분에서는 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 되지 않았으나, Capillarisin을 4, 16, 80, 160 uM 농도별로 처리한 후 LPS로 iNOS와 COX-2를 유도하였을 때, mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 52B and C).

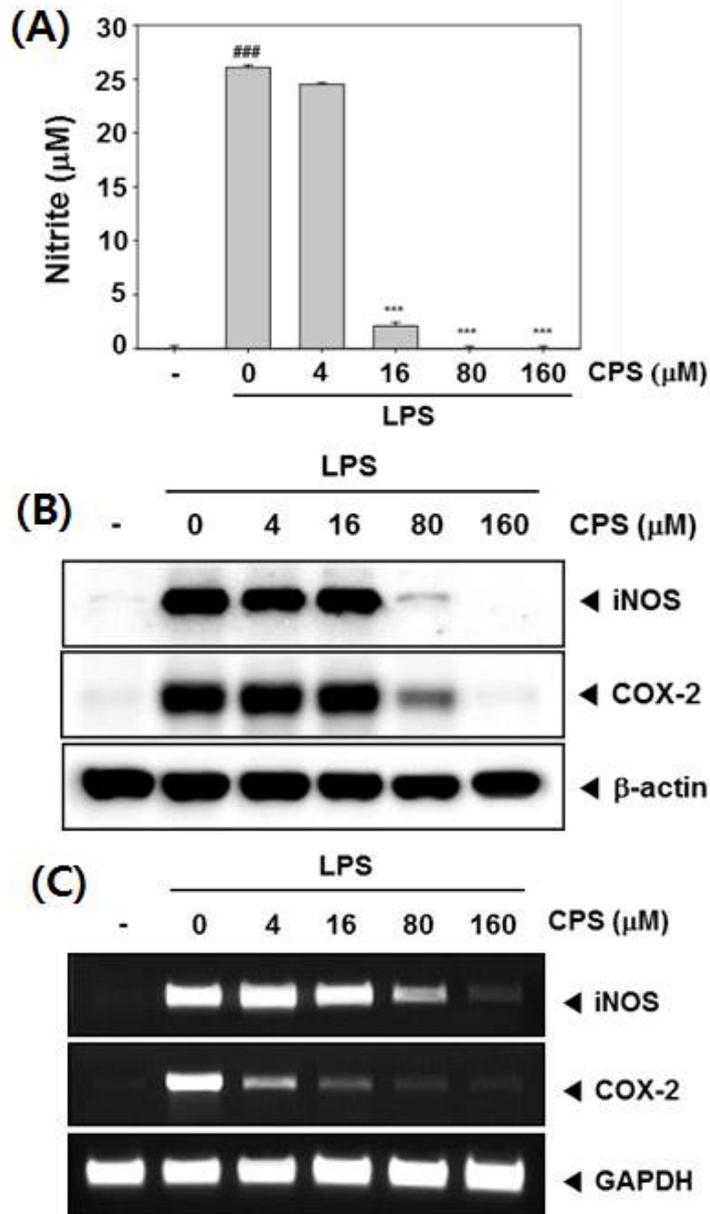


Figure. 52. (A) Cells were pretreated with different concentrations of CPS for 1 h and stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h. The values obtained were compared with those of standard concentrations of sodium nitrite dissolved in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), and the concentrations of nitrite in a conditioned media of sample treated cells were calculated. Data were obtained from three independent experiments and were expressed as means \pm SD. *** $P < 0.001$ indicates significant differences from the LPS treated group, ### $P < 0.001$ indicates significant differences from the unstimulated control group. (B) RAW 264.7 cells were pretreated with different concentrations of CPS for 1 h and stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h. Equal amounts of total proteins (25 µg/lane) were subjected to 8% (for iNOS) and 10% (for COX-2) SDS-PAGE, and the expressions of iNOS and COX-2 proteins were detected by Western blotting using specific anti iNOS and anti COX-2 antibodies. β -actin was used as a loading control. The blots shown are representative of three independent experiments that

had similar results. (C) Inhibition of iNOS and COX-2 mRNA expressions by CPS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of CPS for 1 h before being incubated with LPS (1 ug/mL) for 20 h. Total RNA was isolated, and iNOS and COX-2 mRNA expressions were examined by RT-PCR analysis. PCR of glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH, was performed to control for a similar initial cDNA content of the sample. The results shown are representative of the three independent experiments.

(2) Capillarisin에 의한 LPS로 유도된 NF- κ B의 활성 억제 효과 확인

- 염증에 중요한 전사인자인 NF- κ B는 염증반응에 있어서 iNOS와 COX-2을 조절하므로써 염증 반응을 매개한다고 잘 보고되었다. 이에 본 실험에서는 NF- κ B의 Subunit인 p65의 인산화 정도를 평가하였다. 그 결과 LPS에 의한 p65의 인산화는 15분에서 인산화 되며 Capillarisin을 전 처리한 세포군에서는 이 p65의 인산화가 억제됨을 보였다 (Fig. 53A). 따라서 Capillarisin은 LPS에 유도되는 NF- κ B의 활성을 억제하고 결과적으로 iNOS와 COX-2을 발현을 억제하는 것으로 판단된다.

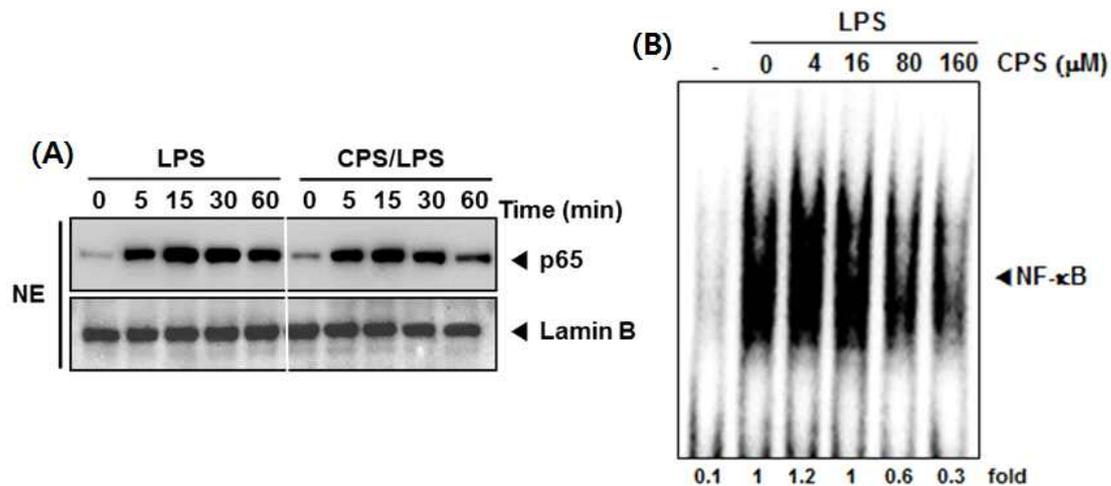


Figure. 53. (A) Cells were pretreated with 160 uM of CPS for 1 h and stimulated with LPS (1 ug/mL) for the indicated times and the nuclear extracts were prepared, resolved by SDS-PAGE, and electrotransferred to a PVDF membrane, after which Western blot analyses using anti p65 antibody was performed. Lamin B protein was used as a loading control. The results shown are representative of the three independent experiments. (B) Cells were pretreated with the indicated concentrations of CPS for 1 h and stimulated with LPS (1 ug/mL) for 1 h; nuclear extracts were prepared as described in the methods section. Detection of NF- κ B binding activities was performed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The specificity of NF- κ B complex formation was verified in the LPS only sample by displacement with a 50-fold excess of the unlabeled mutated oligonucleotide (mut) and a 50-fold excess of the unlabeled consensus oligonucleotide (cold) (Data not shown).

(3) Capillarisin에 의한 LPS로 유도된 p38, ERK1/2, JNK의 인산화 반응 억제능 평가

- 또 다른 염증인자 카이네아제인 MAPKs (ERK, JNK, p38,)에 대한 인산화 정도가 억제되는 것을 평가하였다. 이 결과 Capillarisin이 LPS에 유도되는 ERK, JNK의 인산화를 억제하는 것을 확인 할 수 있었다. 위의 결과로 Capillarisin의 소염효과는 NF-kappaB의 활성억제와 ERK, JNK의 인산화 억제를 통해서 일어난다는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 54).

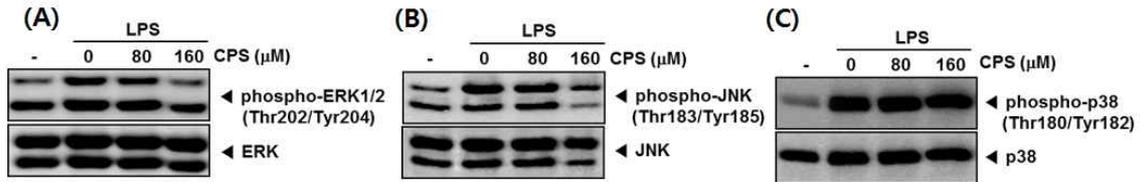


Figure. 54. (A, B, and C) The cells were pretreated with the indicated concentrations of CPS for 1 h and stimulated with LPS (1 ug/mL) for 1 h; whole cell extracts were prepared, resolved by SDS-PAGE, and electrotransferred to a PVDF membrane. After which Western blot analysis using phospho-specific anti-ERK, phospho-specific anti-JNK, and phospho-specific anti-p38 antibodies was performed. The same membranes were reblotted with anti-ERK, anti-JNK, and anti-p38 antibodies. The results shown are representative of the three independent experiments.

(4) Capillarisin에 의한 LPS로 유도된 TNF α , IL-6, IL-1 β , PGE $_2$ 의 생성량 억제 효과 확인

- RAW264.7 대식세포에서 Capillarisin이 LPS에 의한 TNF α , IL-6, IL-1 β , PGE $_2$ 배지에 유리된 억제능을 확인하기 위하여 ELISA 방법을 이용하였다. 우선, LPS만을 처리한 세포군에서는 상당한 량의 TNF α , IL-6, IL-1 β , PGE $_2$ 배지로 분비되는 것을 확인하였고 Capillarisin을 전처리한 세포군에서는 농도의존적으로 TNF α , IL-6, IL-1 β , PGE $_2$ 량이 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 Capillarisin이 염증성 싸이토카인인 TNF α , IL-6, IL-1 β , PGE $_2$ 량을 저해함으로써 항염증 효능을 가진다는 것을 확인하였다 (Fig. 55).

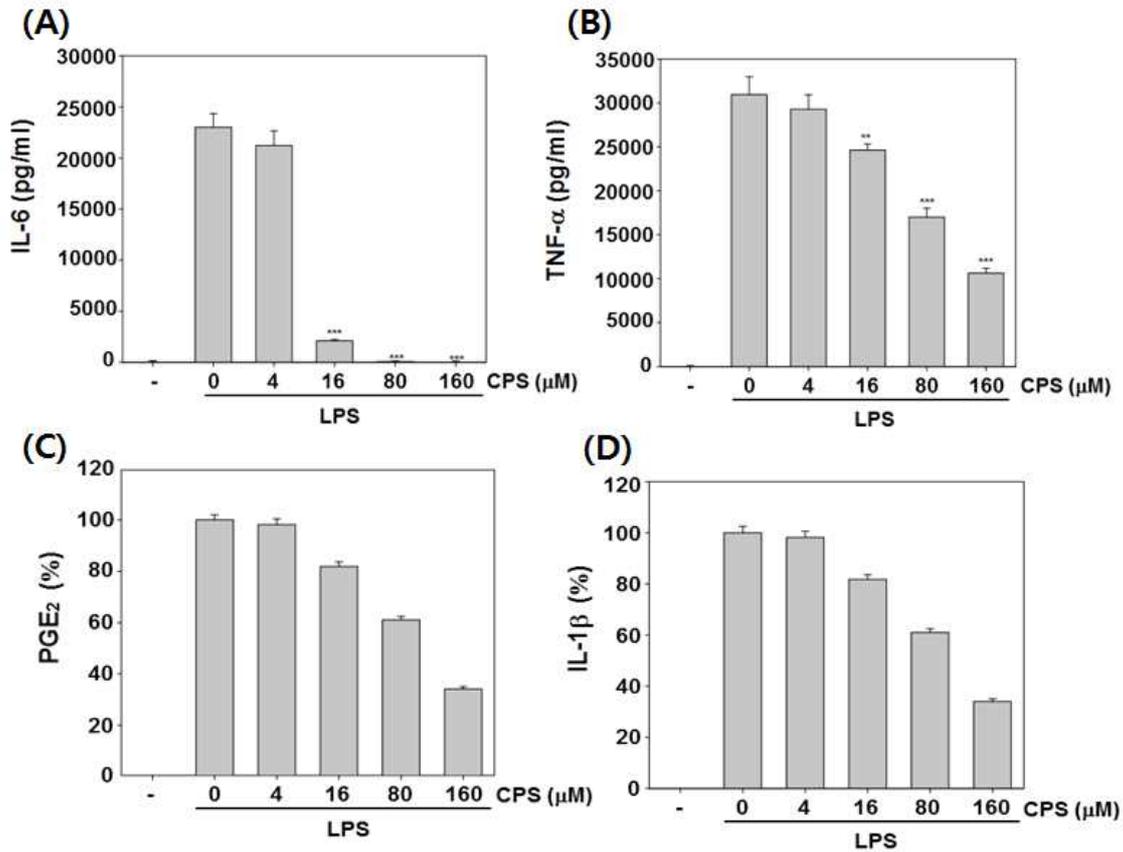


Figure. 55. Cells were pretreated with different concentrations of CPS for 1 h and stimulated with LPS (1 ug/mL final concentration) for 24 h. (A) The amount of TNF- α release was determined by a TNF- α antibody coated enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit, as described in the Materials and methods. (B) The amount of IL-6 release was determined by an IL-6 antibody coated ELISA kit, as described in the Materials and Methods. (C) The amount of PGE₂ release was determined by the mouse PGE₂ ELISA kit. Data were obtained from three independent experiments and were expressed as means \pm SD. (D) The amount of IL-1 β release was determined by an IL-1 β antibody coated ELISA kit.

(5) Capillarisin의 세포증식 억제능 평가

- Capillarisin을 50, 100, 150 uM을 처리한 뒤, U266세포주를 12, 24, 36시간 배양한 결과 Capillarisin을 150 uM 처리한 군에서 농도와 시간 의존적으로 암세포 증식이 억제되는 것을 확인 하였다 (Fig. 56A).
- 유세포 분석기를 이용하여 Capillarisin이 U266세포주의 세포주기에 대한 실험을 해본 결과, Capillarisin을 처리한 군에서는 처리하지 않은 군에서 보다 subG1을 축적을 확인할 수가 있었다. 이는 apoptosis의 주된 특징중에 하나로서 이 분획물에 대한 세포 독성과 세포증식의 억제는 apoptosis의 유발과 관계가 있음을 시사하여 준다 (Fig. 56B).

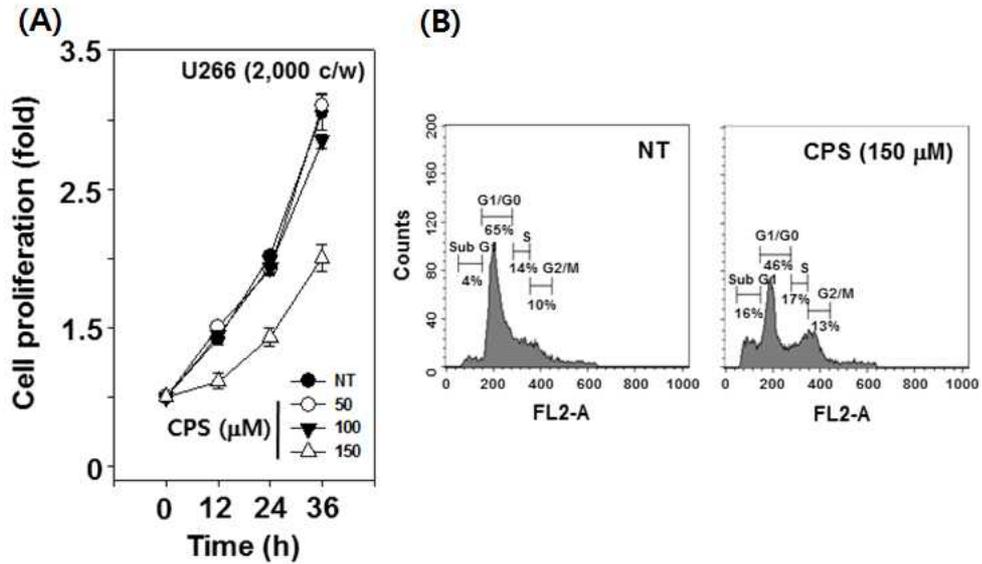


Figure. 56. (A) CPS suppresses cell proliferation in U266 cells were plated in triplicate, treated with 50, 100, and 150 μ M CPS, and then subjected to MTT assay after 12, 24, and 36 h to analyze proliferation of cells. (B) U266 cells were treated 150 μ M of CPS for 24 h, after which the cells were washed, fixed, stained with PI, and analyzed for DNA content by flow cytometry.

(6) Capillarisin에 대한 constitutive STAT3, JAK1, JAK2, Src 활성화도 저해능 평가

- 우리는 Capillarisin을 30, 50, 100, 150 μ M을 세포독성이 없는 6시간 처리한 후에 인산화된 STAT3을 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, Capillarisin을 처리한 군에서 농도 의존적으로 인산화된 STAT3가 억제됨을 확인하였다 (Fig. 57A).
- STAT3에 대한 upstream kinase중 하나인 JAK1에 대해서 Capillarisin에 대한 인산화된 JAK1의 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, 인산화된 JAK1과 JAK1의 발현이 억제됨을 보였다. JAK1의 발현이 억제되는 것이 시료 로딩에 실수는 아닌지 체크하기 위해서 베타액틴을 해본 결과 동일한 시료 로딩임을 확인하였다. 따라서 Capillarisin은 인산화된 JAK1의 활성을 저해할 뿐만 아니라, JAK1의 발현 또한 억제됨을 확인 하였다 (Fig. 57B).
- 또한, STAT3에 대한 upstream kinase중 JAK2에 대해서 Capillarisin에 대한 인산화된 JAK2의 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, 인산화된 JAK2와 JAK2의 발현이 억제됨을 보였다. JAK2의 발현이 억제되는 것이 시료 로딩에 실수는 아닌지 체크하기 위해서 베타액틴을 해본 결과 동일한 시료 로딩임을 확인하였다. 따라서 Capillarisin은 인산화된 JAK2의 활성을 저해할 뿐만 아니라, JAK2의 발현 또한 억제됨을 확인 하였다 (Fig. 57C).
- 또 다른 STAT3에 대한 non-receptor upstream kinase중 하나인 Src에 대해서 Capillarisin에 대한 인산화된 Src의 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, Capillarisin 처리한 군에서 농도 의존적으로 인산화된 Src가 억제됨을 확인하였다 (Fig. 57D).

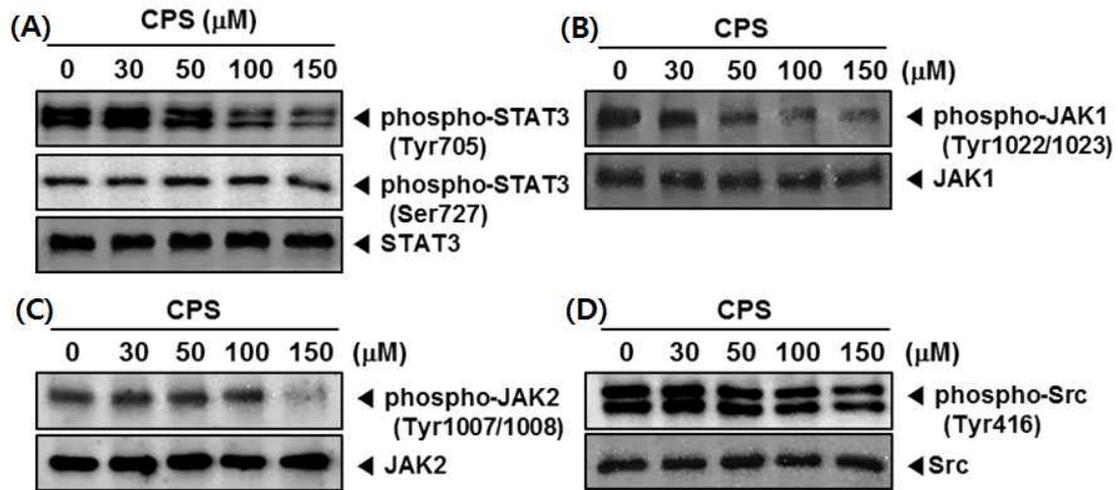


Figure. 57. U266 cells (1×10^6 cells/mL) were treated with 0, 30, 50, 100, and 150 μ M CPS for 6 h. (A) Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for phospho-STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) and phospho-STAT3 (Ser⁷²⁷). The same blots were stripped and reprobed with STAT3 antibody to verify equal protein loading. (B) Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for phospho-JAK1 (Tyr^{1022/1023}). The same blots were stripped and reprobed with JAK1 antibody to verify equal protein loading. (C) Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for phospho-JAK2 (Tyr^{1007/1008}). The same blots were stripped and reprobed with JAK2 antibody to verify equal protein loading. (D) Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for phospho-Src (Tyr⁴¹⁶). The same blots were stripped and reprobed with Src antibody to verify equal protein loading.

(가) Capillarisin에 대한 STAT3 핵 전좌 억제능 평가

- 핵 전좌는 전사인자의 중요한 기능을 하기 때문에 우리는 Capillarisin이 STAT3의 핵 전좌를 억제하는지 확인해보았다. 그 결과 Capillarisin이 다발성 골수종의 핵에 STAT3의 전좌를 억제하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 58).

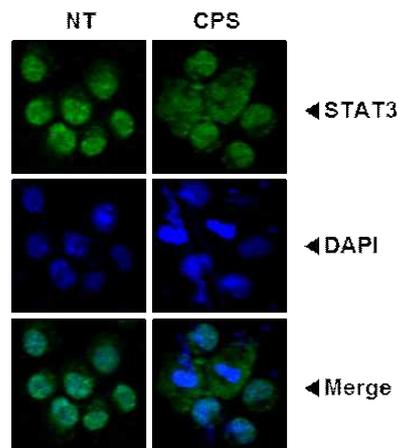


Figure. 58. After 6 h of CPS treatment, the cells were fixed and permeabilized. STAT3 (green) was immunostained with rabbit anti-STAT3 followed by FITC-conjugated

secondary antibodies and the nucleus (blue) was stained with DAPI. The third panels show the merged images of the first and second panels. The results shown are representative of two independent experiments.

(나) Capillarisin과 Pervanadate에 의한 STAT3 억제능 평가

- 우리는 Capillarisin 유도된 STAT3 타이로신 인산화의 억제가 단백질 타이로신 인산가수분해 효소의 활성 때문에 일어나는 것인지 확인해보았다. 그 결과, 단백질 타이로신 인산가수분해 효소의 억제제인 pervanadate는 Capillarisin 유도된 STAT3 활성을 억제하였다 (Fig. 59A).
- SHP1, SHP2, PTEN은 단백질 타이로신 인산가수분해효소이다. 우리는 Capillarisin이 다발성 골수종에서 SHP1, SHP2, PTEN의 발현을 조절할 수 있는지 웨스턴 블랏을 이용하여 확인해보았다. 그 결과 Capillarisin은 SHP1과 SHP2의 발현을 유도하였지만 PTEN의 발현에는 영향을 미치지 않았다 (Fig. 59B).
- 위에서 수행하였던 단백질 타이로신 인산가수분해효소의 발현이 mRNA의 발현 수준과 관련이 있는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 Capillarisin은 SHP1과 SHP2의 mRNA 발현을 유도하였지만 PTEN의 mRNA 발현에는 변함이 없었다 (Fig. 59C).

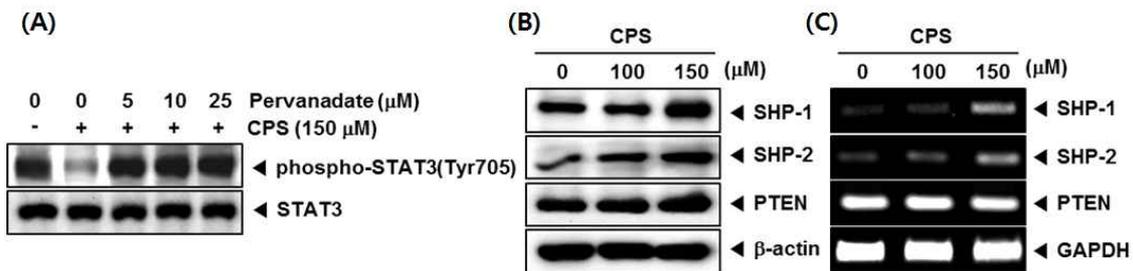


Figure. 59. (A) U266 cells were treated with the indicated concentrations of pervanadate and 150 uM CPS for 6 h. Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for phospho-STAT3 (Tyr⁷⁰⁵). The same blots were stripped and reprobed with STAT3 antibody to verify equal protein loading. (B and C) U266 cells were treated with the indicated concentrations of CPS for 6 h. (B) Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for SHP-1, SHP-2, and PTEN. The same blots were stripped and reprobed with β-actin antibody to verify equal protein loading. (C) Total RNA was extracted and examined for expression of SHP-1, SHP-2, and PTEN by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control to show equal RNA loading.

(7) Capillarisin의 apoptosis 유발능 평가

(가) Capillarisin에 대한 Annexin V와 TUNEL assay를 통한 apoptosis 평가

- Annexin V와 TUNEL 에세이를 통해서 다발성 골수종 U266에서 Capillarisin이 apoptosis 유발 여부를 측정하였다. 그 결과 Capillarisin을 처리한 군에서는 Annexin

V positive 세포가 20%로 증가함을 보였고 TUNEL 에세이를 통해서 또한 Capillarisin을 처리한 군에서는 DNA 절편이 14% 쪼개지는 것을 확인하였다. 따라서, 이 두가지 에세이를 통해서 Capillarisin이 확실히 apoptosis를 유발함을 확인하였다 (Fig. 60A and B).

- 전사인자 중에 하나인 STAT3의 활성화는 Master switch로서 암세포의 생존에 꼭 필요한 생존단백질과 암세포 주기에 관련된 단백질 발현에 관여를 하게된다. Capillarisin을 농도별로 처리함에 따라 STAT3 타겟 유전자인 Bcl-xl, Bcl-2, Survivin, Cyclin D1, IAP1의 발현을 조사하여 보았다. 그 결과, Capillarisin을 처리한 군에서는 Bcl-xl, Bcl-2, Survivin, Cyclin D1, IAP1의 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 보였다 (Fig. 60C).
- 위에서 수행하였던 Bcl-xl, Bcl-2, Survivin, Cyclin D1, IAP1 단백질의 발현이 mRNA의 발현 수준과 관련이 있는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. Capillarisin을 30, 50, 100, 150 uM 농도별로 처리하였을 때 Bcl-xl, Bcl-2, Cyclin D1, Survivin mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 60D).

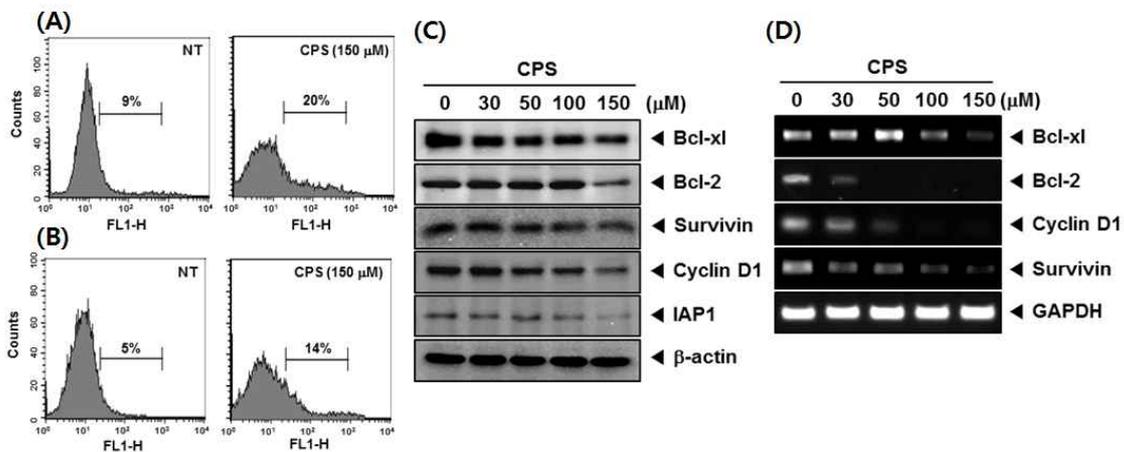


Figure.60. (A and B) U266 cells were treated 150 uM of CPS for 24 h, incubated with an anti-Annexin V antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (A), TUNEL-Label mix conjugated with the TUNEL-Enzyme (B) and then analyzed with a flow cytometer for apoptotic DNA fragmentation effects. (C and D) U266 cells were treated with the indicated concentrations of CPS for 24 h. (C) Whole-cell extracts were prepared; 30 ug portions of those extracts were resolved on 10% SDS-PAGE and probed against Bcl-xl, Bcl-2, Cyclin D1, Survivin, and IAP1 antibodies. The same blots were stripped and reprobed with β -actin antibody to verify equal protein loading. (D) Total RNA was extracted and examined for the expression of Bcl-xl, Bcl-2, CyclinD1, and Survivin by RT-PCR. GAPDH was used as an internal control to show equal RNA loading.

(나) Capillarisin에 대한 Caspase-3 활성과 PARP Cleavage 평가

- 앞서 보여준 결과에서는 Capillarisin이 STAT3, JAK2, Src 활성을 억제됨을 보였고 STAT3에 의해 조절되는 여러 가지 단백질 또한 발현이 억제됨을 보였다. 우리는 여

기서 앞에서 언급했듯이 apoptosis 유발에 중추적인 단백질인 Caspase-3의 활성화와 PARP cleavage를 통해서 정말로 Capillarisin이 apoptosis를 유발하는 가를 다시 한번 측정을 해보았다. 그 결과 Capillarisin이 Caspase-3의 활성을 유도하고 나아가서 PARP cleavage를 유발하여 apoptosis를 일으키는 것으로 최종적으로 결론을 얻었다 (Fig. 61A).

- 우리는 Capillarisin이 STAT3의 DNA 바인딩 활성을 억제하는지 확인해보았다. 핵 추출물을 이용한 EMSA 분석에서 Capillarisin이 농도와 시간의존적으로 STAT3 DNA 바인딩 활성을 저해시킴을 확인 할 수 있었다 (Fig. 61B).

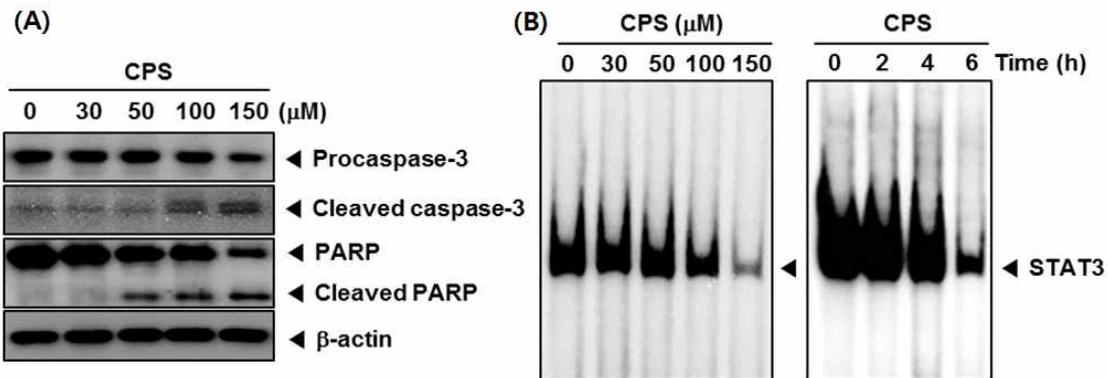


Figure. 61. (A) U266 cells were treated with the indicated concentrations of CPS for 24 h. Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for Caspase-3 and PARP. The same blots were stripped and reprobed with β -actin antibody to verify equal protein loading. (B) U266 cells were treated with the indicated concentrations of CPS for 6 h and analyzed for nuclear STAT3 levels by EMSA (*left panel*). U266 cells (1×10^6 cells/mL) were treated with 150 μ M CPS for the indicated times and analyzed for nuclear STAT3 levels by EMSA (*right panel*).

(8) Capillarisin과 Bortezomib이 STAT3 타겟 유전자의 단백질 발현 평가

- Capillarisin과 Bortezomib을 병합처리하여 STAT3 타겟 유전자들의 발현을 조사하여 보았다. 그 결과, Capillarisin을 단독으로 처리했을 때 보다 Capillarisin과 Bortezomib을 병합처리하였을 때 STAT3 타겟 유전자들이 더 많이 억제됨을 보였다 (Fig. 62A).
- Capillarisin과 Bortezomib을 병합처리하였을 때 apoptosis 유발에 중추적인 단백질인 PARP cleavage와 Caspase-3의 활성의 변화가 있는지 확인해보았다. 그 결과 Capillarisin과 Bortezomib이 Caspase-3의 활성을 유도하고 나아가서 PARP cleavage를 유발하였다 (Fig. 62B).

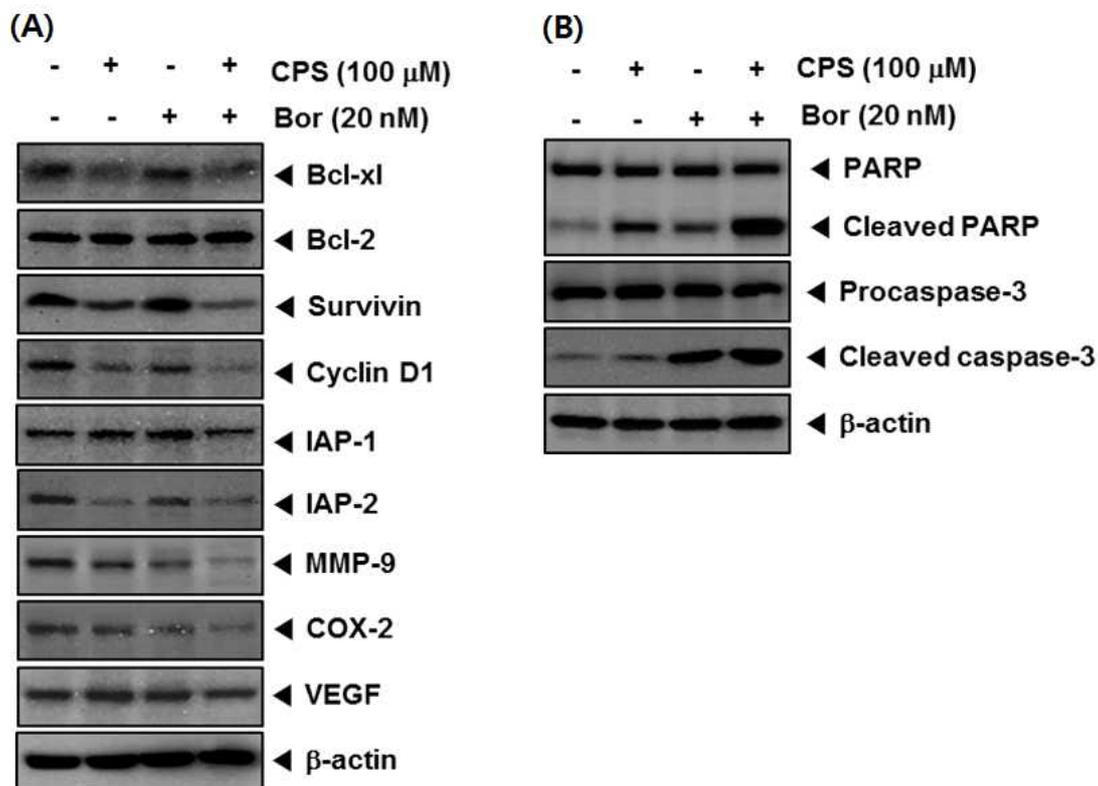


Figure. 62. U266 cells (1×10^6 cells/well) were cotreated with CPS for 6 h prior to bortezomib treatment and added with bortezomib for 24 h, (A) And then whole-cell extracts were prepared; 30 ug portions of those extracts were resolved on 10% SDS-PAGE and probed against anti-apoptotic, proliferative, and metastatic, and angiogenic gene products. The same blots were stripped and reprobed with β -actin antibody to verify equal protein loading. (B) Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies against Caspase-3 and PARP. The same blots were stripped and reprobed with β -actin antibody to verify equal protein loading.

제 5절 당유자 과피 에센셜 오일에 의한 U373MG 세포에서의 세포 증식 억제 및 세포사멸 효능 평가

1. 당유자 과피 에센셜 오일에 의한 U373MG 세포에서의 세포 증식 억제 효능 탐색

- MTT assay를 통하여 human glioblastoma인 U373MG에서 제주 당유자 과피 에센셜 오일의 항암 효능을 측정한 결과 12시간 처리시 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서부터 농도 의존적으로 세포의 성장 억제를 확인 할 수 있었다 (Fig 63).

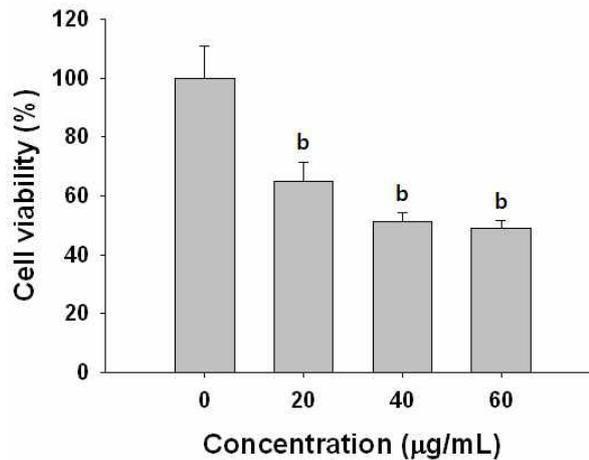


Figure. 63. Cell growth inhibition. The values presented are the means \pm SD (n=4). Viability was determined on the basis of MTT reduction. Human U373 glioblastoma cells were treated with Dangyuja peel essential oil (DPEO). ^b*P* < 0.01, compared to the control.

2. 당유자 과피 에센셜 오일에 의한 U373MG 세포에서의 apoptosis 확인

- Hoechst33342 염색 시약을 이용하여 당유자 에센셜 오일을 20-60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리된 세포에서의 핵을 염색하여 형광현미경을 통해 관찰 한 결과 농도 의존적으로 핵의 응축 (apoptotic body) 현상을 확인 할 수 있었다 (Fig 46A). 또한 DNA를 추출하여 agarose 전기영동을 통하여 DNA를 확인 한 결과 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서부터 DNA의 절편화를 확인 할 수 있었다 (Fig 64B).

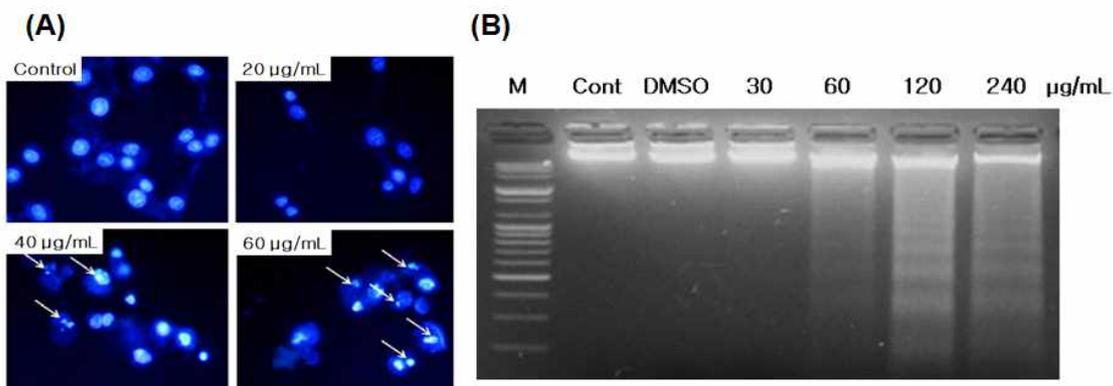


Figure. 64. Effects of DPEO on nuclear Hoechst33342 staining and DNA fragmentation.

Cells were treated with DMSO or with the indicated concentration of DPEO for 12 h. (A) Treated cells were stained with Hoechst 33342 and the stained nuclei were visualized under a fluoresce microscope. (B) DNA fragmentation was analyzed by 1.8% agarose gel electrophoresis.

- 당유자 과피 에션셜 오일에 의한 세포주기의 변화를 FACS analysis를 통해 측정하였다 (Table 17). 그 결과 60 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 sub-G1기의 증가를 확인할 수 있었다 (Table 17). 또한 미토콘드리아 membrane potential을 JC-1 염색을 통해 확인 한 결과 위와 마찬가지로 60 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 확인한 감소를 확인할 수 있었다 (Fig. 65).

Table 17. The percentage of cell cycle phase in the DPEO-treated U373 cells for 12 h.

	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)			
	0	20	40	60
Sub-G1	0.23 \pm 0.14	0.25 \pm 0.07	1.96 \pm 1.04	72.69 \pm 3.95 ^b
G1	54.81 \pm 5.07	52.46 \pm 2.45	51.07 \pm 4.02	15.05 \pm 2.04
S	18.30 \pm 1.62	17.78 \pm 0.54	13.69 \pm 3.77	6.23 \pm 1.89
G2/M	27.11 \pm 6.21	29.99 \pm 3.07	33.66 \pm 7.51	6.26 \pm 0.56

^b $P < 0.01$, compared to the control.

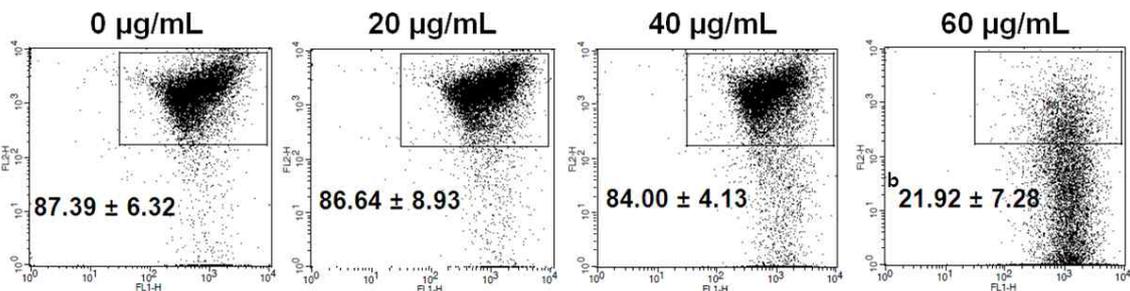


Figure. 65. Effects of DPEO on mitochondria membrane potential. Cells were treated with DMSO or with the indicated concentration of DPEO for 12 h. Mitochondria membrane potential was determined by flow cytometry after staining with JC-1 in DPEO treated U373 cells (C). ^b $P < 0.01$, compared to the control.

- 당유자 과피 에션셜 오일을 12시간 처리한 후 세포를 lysis하여 단백질을 추출한 뒤 SDS-PAGE 전기영동을 통해 단백질을 크기별로 나눈 뒤 transfer를 통해 PVDF membrane에 단백질을 부착시킨 뒤 항원 항체 반응을 통해 apoptosis 관련 단백질들을 확인한 결과 PARP의 cleavage와 capase-8, caspase-3의 활성화를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 66).

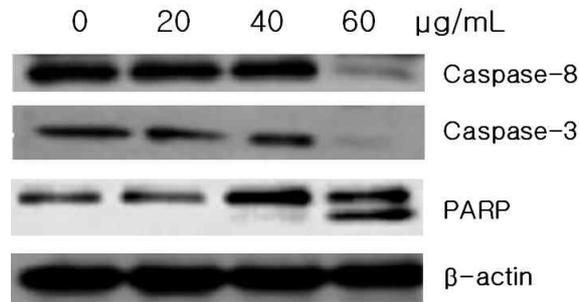


Figure. 66. Immunoblot analysis of apoptosis-related protein expression in DPEO treated U373 cells. Cells were lysed after 12 h of incubation with the indicated concentration of DPEO. Cellular proteins were separated by SDS-PAGE and were transferred onto PVDF membranes. b-actin was used as an internal control.

3. 당유자 과피 에센셜 오일 성분분석

- 당유자 과피 에센셜 오일에 대한 성분 분석은 GC/MS로 분석하였다. 검출된 휘발성유기 화합물의 목록은 Table 18에 표현하였다.

Table 18. Major components (in %) of Dangyuja peel essential oil separated by gas chromatography-mass spectroscopy.

RT	RI ^{a)}	Name of the compound ^{b)}	Area % ^{c)}
10.765	932	α -pinene	0.49
12.659	976	Sabinene	0.07
13.581	993	β -myrcene	32.23
15.693	1036	dl-limonene	64.69
16.440	1053	β -ocimene	0.45
17.613	1076	Linalool oxide	0.4
18.398	1090	trans-linalool oxide	0.2
19.025	1101	Linalool	0.18
21.704	1157	Citronella	0.11
23.574	1193	p-menth-1-en-8-ol	0.1
25.081	1224	7-ethyliden	0.1
26.042	1245	Z-citral	0.04
27.474	1274	Citral	0.06
32.325	1379	α -copaene	0.05
32.670	1386	Neryl acetate	0.09
34.286	1423	trans-cCaryophyllene	0.1
36.974	1485	Germacrene-D	0.41
38.756	1528	δ -cadinene	0.08
54.644	1956	Hexadecapentaene	0.11
55.798	1990	Farnesol	0.04

^{a)} retention indices relative to C7-C30 n-alkanes calculated on Rtx-5MS capillary column.

^{b)} supercritical CO₂ extract of fruit compounds tentatively identified based on retention index and elution order as well as the fragmentation pattern described in the literature.

^{c)} relative peak area percentage (peak area relative to the total peak area %)

제 6절 당유자 잎 분획물의 세포변이억제효능 탐색 및 활성화에 기여하는 천연활성물질(phytochemicals) 발굴

1. 당유자 잎에서 분리한 여러가지 분획물에 대한 전립선 암세포 세포사멸기작 확인

가. 당유자 잎에서 분리한 여러가지 분획물에 대한 전립선 암세포 세포사멸 확인

- 전립선 세포주인 DU145에서 에틸아세테이트, 클로로폼, 부탄올 분획물을 처리한 결과, 클로로폼 분획물에서 30-100 ug/mL에서 유의성 있는 세포독성을 관찰하였다 (Fig. 67).

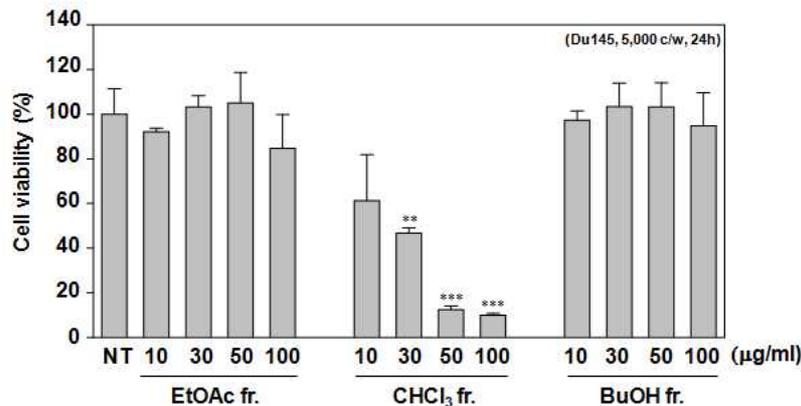


Figure. 67. Effect of the chloroform (CHCl_3) fraction of Dangyuja leaves (DCF) on cytotoxicity. Cells were treated with three fractions from Dangyuja leaves (10, 30, 50, or 100 $\mu\text{g/mL}$) for 24 hours, and cell viability was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Results of independent experiments were averaged and are shown as percentage cell viability compared with the viability of nontreated (NT) cells. Data are mean \pm SD values of three measurements.

나. 당유자 클로로폼 분획물의 세포증식 억제능 평가

- 당유자 클로로폼 분획물을 50과 100 ug/mL을 처리한 뒤, DU145세포주를 24시간 36시간 배양한 결과 아무것도 처리하지 않은 군에서는 36시간까지 2배의 세포증식을 보였다. 하지만 당유자 클로로폼 분획물을 처리한 군에서는 농도와 시간 의존적으로 암세포 증식이 억제되는 것을 확인 하였다 (Fig. 68A).
- 전립선 암세포주에서 독성을 보인 당유자 클로로폼 분획물이 정상 전립선 세포에도 영향을 미치는지 조사하여 본 결과, 이 분획물은 전립선 암세포주에서 유독 강한 독성을 보였지만 정상 전립선 세포에서는 상대적으로 세포독성에는 별 영향이 없음을 보여주기 때문에 안정성이 있음을 간접적으로 보여주고 있다 (Fig. 68B).

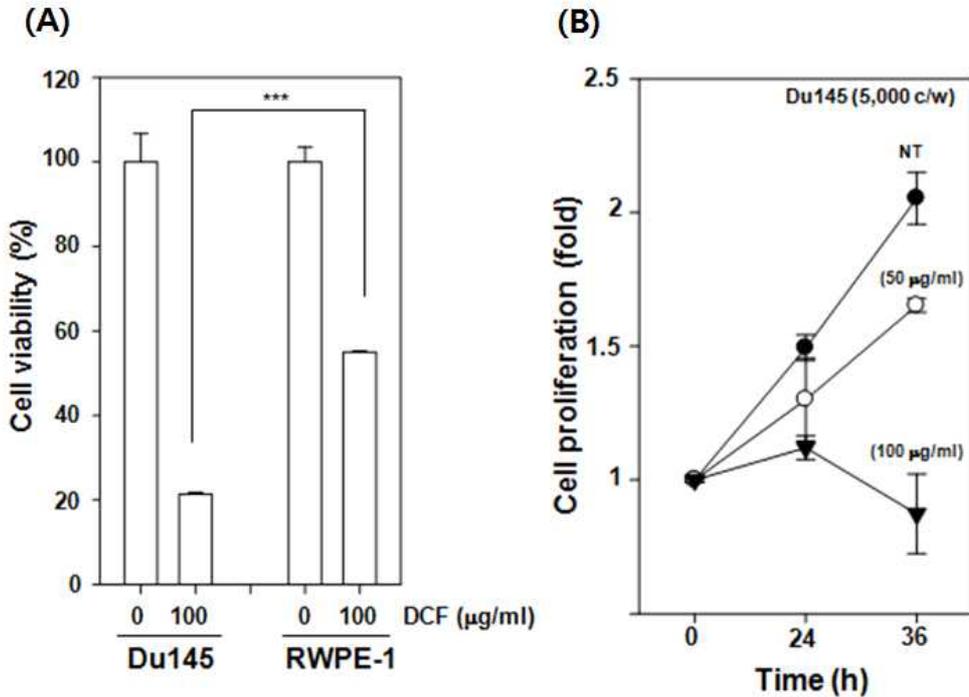


Figure. 68. Effect of DCF on proliferation and exerts strong cytotoxicity against DU145 cells compared with noncancerous RWPE-1 human prostate cells. DU145 cells were plated in triplicate and treated with DCF (0, 50, or 100 µg/mL) (A) And then cell proliferation was analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. (B) DCF exerted strong cytotoxicity against DU145 cells compared with noncancerous RWPE-1 human prostate cells.

다. 당유자 클로로폼 분획물의 세포주기 평가

- 유세포 분석기를 이용하여 당유자 클로로폼 분획물이 DU145세포주의 세포주기에 대한 실험을 해본 결과, 이 분획물을 처리한 군에서는 처리하지 않은 군에서 보다 10이상의 subG1 을 축적을 확인을 할 수가 있었다. 이는 apoptosis의 주된 특징중에 하나로서 이 분획물에 대한 세포독성과 세포증식의 억제에 apoptosis의 유발과 관계가 있음을 시사하여 준다 (Fig. 69).

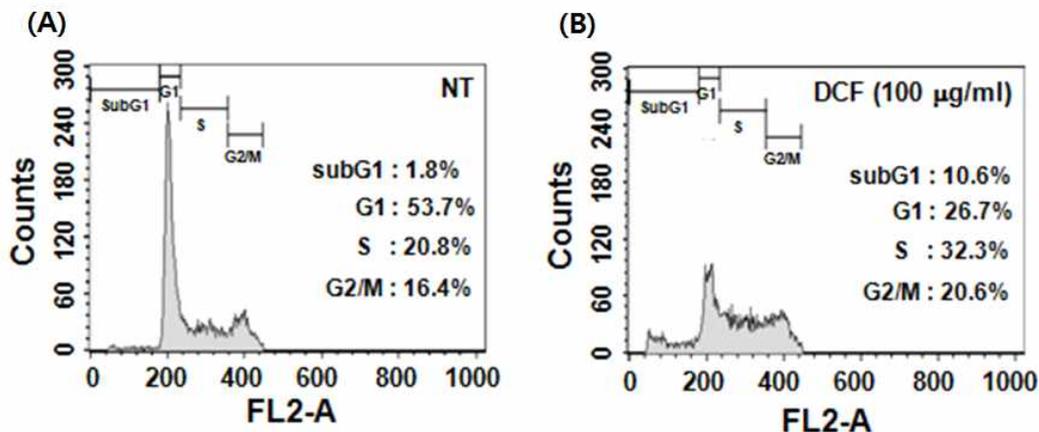


Figure. 69. Effect of DCF on cell cycle. DU145 cells were treated with vehicle (0.1% dimethyl sulfoxide, A) of DCF (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, B). After a 24-hour incubation, cells were harvested, washed with cold phosphate-buffered saline, and digested with RNase. Cellular DNA staining with propidium iodide and flow cytometric analysis were done to determine the cell cycle distribution. Data are from one representative experiment of three independent experiments that had similar values among all the results. ** $P < .01$, *** $P < 0.001$. BuOH, n-butanol; c/w, cells per well; EtOAc, ethyl acetate.

라. 당유자 클로로폼 분획물에 대한 constitutive STAT3 활성화도 저해능 평가

- 우리 실험실에서는 예비 데이터에서 전립선 암세포주 DU145가 constitutive STAT3활성을 보임을 먼저 확인하였다. 따라서 우리는 당유자 클로로폼 분획물을 30-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 세포 독성이 없는 8시간 처리한 후에 인산화된 STAT3을 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, 당유자 클로로폼 분획물 처리한 군에서 농도의존적으로 인산화된 STAT3가 억제됨을 확인 하였다 (Fig. 70).

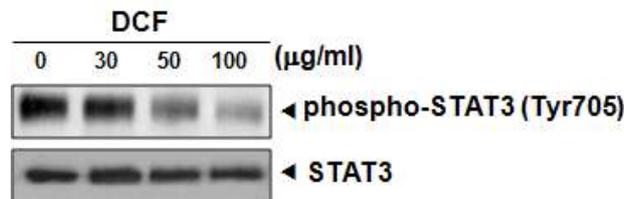


Figure. 70. DCF suppresses constitutive activation of the signal transducer and activator of transcription (STAT) 3. DU145 cells were treated with DCF (0, 30, 50, or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 8 hours. Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for phospho-STAT3 and STAT3.

마. 당유자 클로로폼 분획물에 대한 constitutive JAK2 활성화도 저해능 평가

- 또한, STAT3에 대한 upstream kinase중에 하나인 JAK2에 대해서 이 분획물에 대한 인산화된 JAK2의 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, 인산화된 JAK2와 JAK2의 발현이 억제됨을 보였다. JAK2의 발현이 억제되는 것이 시료 로딩에 실수는 아닌지 체크하기 위해서 베타액틴을 해본 결과 동일한 시료 로딩임을 확인하였다. 따라서 당유자 클로로폼 분획물은 인산화된 JAK2의 활성을 저해할 뿐만 아니라, JAK2의 발현또한 억제됨을 확인 하였다 (Fig. 71).

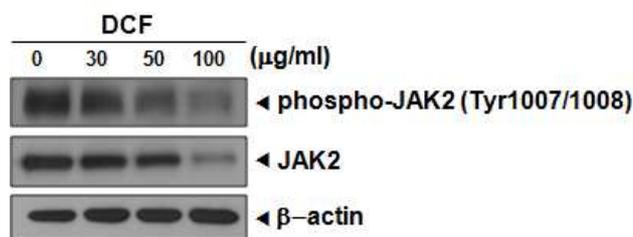


Figure. 71. DCF suppresses constitutive activation of Janus like kinase (JAK) 2. DU145 cells

were treated with DCF (0, 30, 50, or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 8 hours. Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for phospho-JAK2 and JAK2.

바. 당유자 클로로포름 분획물에 대한 constitutive Src 활성화도 저해능 평가

- 또 다른 STAT3에 대한 non-receptor upstream kinase중에 하나인 Src에 대해서 이 분획물에 대한 인산화된 Src의 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, 당유자 클로로포름 분획물 처리한 군에서 농도의존적으로 인산화된 Src가 억제됨을 확인하였다 (Fig. 72).

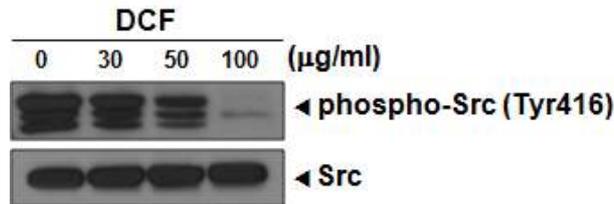


Figure. 72. DCF suppresses constitutive activation Src. DU145 cells were treated with DCF (0, 30, 50, or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 8 hours. Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for phospho-Src and Src.

사. 유일한 STAT3 저해제로 알려진 AG490에 대한 STAT3 활성화 억제능 평가

- 이 실험은 앞서 보여준 당유자 클로로포름 분획물이 정말로 STAT3 활성화 저해와 연관이 있는 가를 확인하는 실험이다. 따라서 STAT3 저해제로 잘 알려진 AG490은 당연히 인산화 된 STAT3 활성을 저해함을 보였다 (Fig. 73C).
- 앞서 보여준 AG490의 STAT3 활성화 억제함으로써 전립선 암세포주의 세포증식도 마찬가지로 억제됨을 보였다 (Fig. 73A). 이 결과로써 당유자 클로로포름의 STAT3 활성을 억제함으로써 전립선 암세포주의 세포증식을 차단 할 수가 있음을 시사하여 준다. 앞서 보여준 AG490에 대한 STAT3 활성화 억제능과 세포증식 억제는 Caspase-3을 활성을 유도함으로 apoptosis를 유발한다는 결과를 얻었다 (Fig. 73B). 왜냐하면, Caspase-3는 apoptosis를 유도하기 위한 매우 중요한 단백질이기 때문이다.

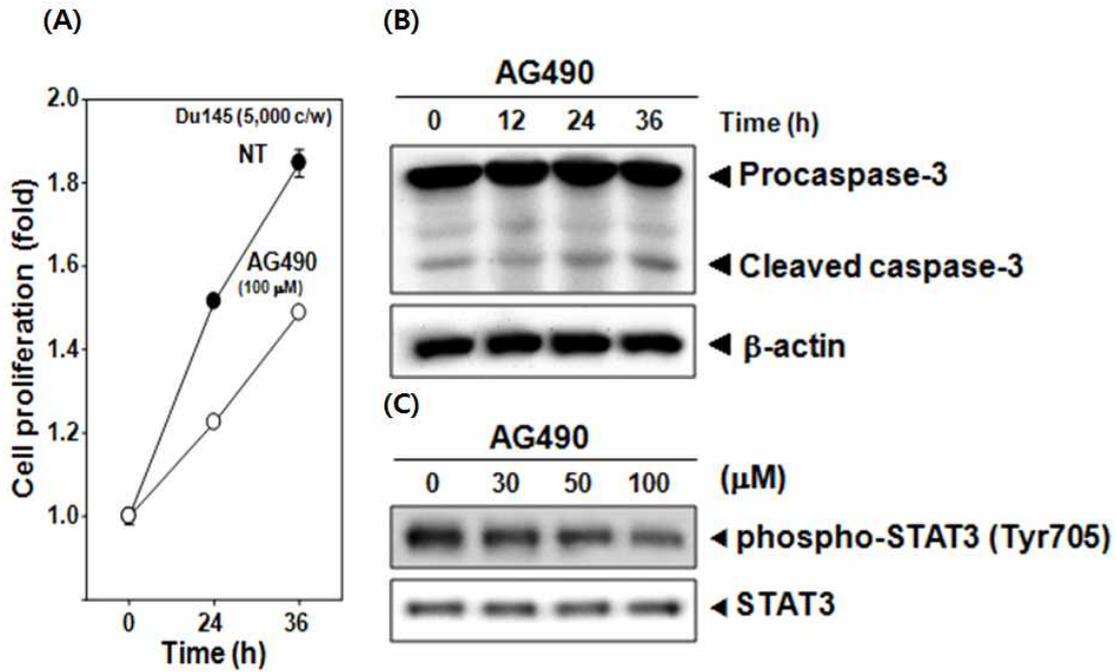


Figure. 73. AG490 suppresses cell proliferation and induces caspase-3 activation. DU145 cells were plated in triplicate and treated with 100 μM AG490 for the indicated times, and then cell proliferation was analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays (A). DU145 cells were treated with AG490 (100 μM) for the indicated time intervals. Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibody against caspase-3 or β-actin, which was used as a loading control (B and C). AG490 suppresses activation of STAT3. DU145 cells (2×10^5 cells per well) were treated with indicated concentrations of AG490 for 8 hours, and whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies for caspase-3, phospho-STAT3 and STAT3.

아. 당유자 클로로폼 분획물에 활성물질 탐색

- 더 나아가서 우리는 당유자 클로로폼 분획물에 어떠한 활성물질이 있어서 항암효능을 보이는가를 알아보기 위해서 UV 스펙트럼과 Ion 크로마토그램을 이용하여 여러 가지 활성물질을 탐색해 본 결과, 당유자 클로로폼 분획물에서 nobiletin (NB)이 함유됨을 확인하였다 (Fig. 74).

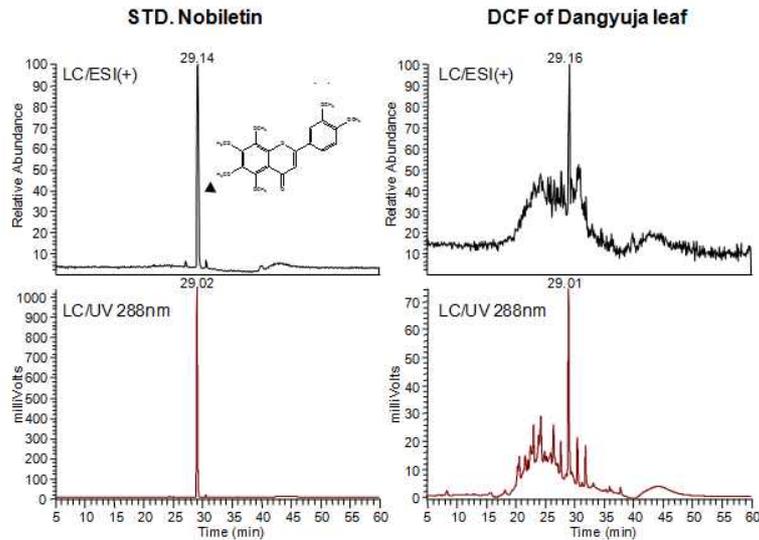


Figure. 74. Identification of nobiletin in DCF. Liquid chromatography (LC)/electrospray ionization (ESI)-mass spectrometry profile: total ion chromatograms and ultraviolet (UV) spectra at 288 nm of nobiletin standard (STD) and DCF of Dangyuja leaves.

2. Nobiletin에 대한 constitutive STAT3 활성화도 저해능 평가

가. Nobiletin에 대한 constitutive STAT3, JAK, Src활성도 저해능 평가

- 우리는 Nobiletin을 30-100 uM을 세포독성이 없는 8시간 처리한 후에 인산화된 STAT3을 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, nobiletin 처리한 군에서 농도의존적으로 인산화된 STAT3가 억제됨을 확인하였다 (Fig. 75A). 동일하게 Nobiletin을 30-100 uM을 세포독성이 없는 8시간 처리한 후에 인산화된 Src을 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, nobiletin 처리한 군에서 농도의존적으로 인산화된 Src가 억제됨을 확인하였다 (Fig. 75B). 또 다른 STAT3에 대한 non-receptor upstream kinase중에 하나인 Src에 대해서 nobiletin에 대한 인산화된 Src의 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, nobiletin 군에서 농도의존적으로 인산화된 Src가 억제됨을 확인하였다 (Fig. 75C).

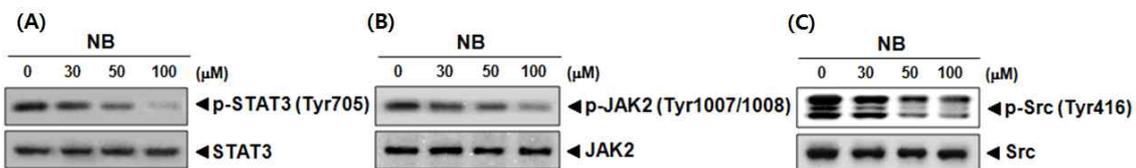


Figure. 75. Nobiletin suppresses constitutive activation of STAT3, JAK and Src. DU145 cells were treated with nobiletin (NB; 0, 30, 50, or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 8 hours. Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibodies. (A) Phospho-STAT3 and STAT3. (B) Phospho-JAK2 and JAK2. (C) Phospho-Src and Src.

나. Nobiletin에 대한 Caspase-3 활성화와 PARP Cleavage 평가

- 앞서 보여준 결과에서는 nobiletin이 STAT3, JAK2, Src 활성을 억제됨을 보였다. 앞에서

언급했듯이 apoptosis 유발에 중추적인 단백질인 Caspase-3의 활성화와 PARP cleavage을 통해서 정말로 이 nobiletin이 apoptosis를 유발하는 가를 다시한번 측정을 해보았다. 그 결과 nobiletin이 Caspase-3의 활성을 유도하고 나아가서 PARP cleavage를 유발하여 apoptosis를 일으키는 것으로 최종적으로 결론을 얻었다. 따라서 당유자 클로로폼 분획물의 apoptosis의 유발은 적어도 이 분획물에 포함된 nobiletin에 의해 기인하는 것으로 사료된다 (Fig. 76).

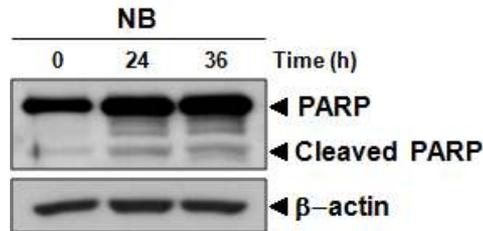


Figure. 76. Nobiletin induces apoptosis by PARP cleavage. DU145 cells (2×10^5 cells per well) were treated with NB (50 μ M) for the indicated time intervals. Whole-cell extracts were prepared and immunoblotted with antibody against PARP. β -Actin was used as a loading control.

다. Nobiletin에 의한 세포내 단백질의 변화 조사

- 이전 연구에서 nobiletin이 SNU-16 세포에서 apoptosis를 유도할 수 있음을 보고하였다. 따라서 nobiletin에 의한 세포죽음에 대해서 세포내 신호전달 체계를 확립하기 위한 실험으로 2-dimensional gel electrophoresis (2-DE)를 수행하였다. Nobiletin 처리군과 비처리군과의 단백질의 발현 변화를 알아본 결과, 비처리군과 비교하여 단백질의 발현이 2배 이상의 차이가 나는 62개의 spot을 얻을 수 있었고 (Fig. 77), 그 중 20개의 spot을 지정하여 단백질 동정을 수행하였다 (Table 19). 그 중 17개의 단백질에 대한 동정이 성공적으로 이루어졌으며, 이 중 ER-stress와 관련되어 있는 GRP78이라는 단백질이 nobiletin에 의해 발현이 증가됨을 확인 할 수 있었다.

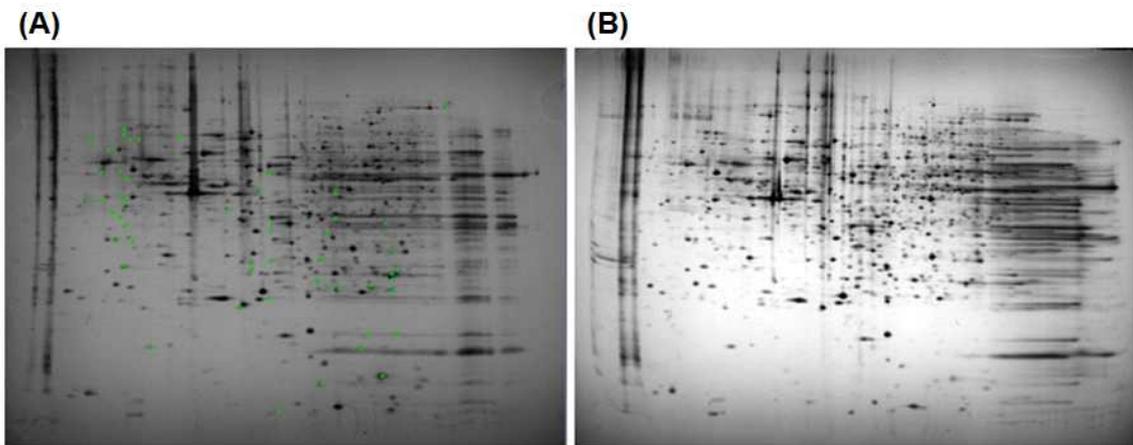


Figure. 77. Representative 2-DE maps of proteins of human gastric cancer SNU-16 cell

line. (A: Control, B: treated-nobiletin 50 μ M). The gels were silver stained. Solubilized proteins were focused on IPG strips (pH 4-10, 24 cm) and separated in SDS-polyacrylamide gradient gels (10 - 16%).

Table 19. Proteins identified from the 2-DE gels of human gastric cancer SNU-16 cell line by PMF.

	Identified protein	Score	Expect	Fold % vol.
1	spermine synthase	120	2.3e-07	3.34
2	Chain B, histocompatibility Antigen Hla-Dm	67	0.045	3.64
3	rho GDP-dissociation inhibitor 1 isoform a	135	7.4e-09	1.92
4	mitochondrial ATP synthase, H ⁺ transporting F1 complex beta subunit	136	5.9e-09	3.22
5	78 kDa glucose-regulated protein	241	1.9e-19	6.44
6	TXNDC5 protein	233	1.2e-18	5.12
7	COMM domain-containing protein 9 isoform 2	91	0.00017	0.29
8	eukaryotic translation initiation factor 4E, isoform CRA_e	73	0.011	0.40
9	Chain A	183	1.2e-13	4.15
10	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2, isoform CRA_a	93	0.00012	56.08
11	EF-hand calcium binding domain 6	85	0.00068	2.41
12	peroxiredoxin 3, isoform CRA_c	66	0.058	0.80
13	proteasome subunit beta type-3	71	0.017	0.69
14	Chain A, crystal structure of The Protein-Disulfide Isomerase Related Chaperone Erp29	66	0.055	0.60
15	fatty acid-binding protein, epidermal	64	0.083	0.58
16	peroxiredoxin-6	240	2.3e-19	0.60
17	proteasome subunit alpha type-6	133	1.2e-08	0.63

라. Nobiletin에 의한 GRP78 단백질의 발현 변화 관찰

- 2-DE 이미지 결과 nobiletin에 의해 증가되었던 GRP78 단백질에 대해 RT-PCR과 western blot을 통해 nobiletin을 농도별로 SNU-16 세포에 처리하여 확인하였다. 그 결과 nobiletin의 농도가 증가될수록 GRP78의 mRNA와 단백질의 발현이 증가됨을 확인 할 수 있었다 (Fig. 78B and C). 또한 다른 위암 세포주인 AGS와 SNU-1 세포에서는 GRP78 발현이 증가되지 않음을 확인함으로써 SNU-16 세포에서 특이적으로 GRP78의 발현이 유도됨을 확인하였다 (Fig. 78A).

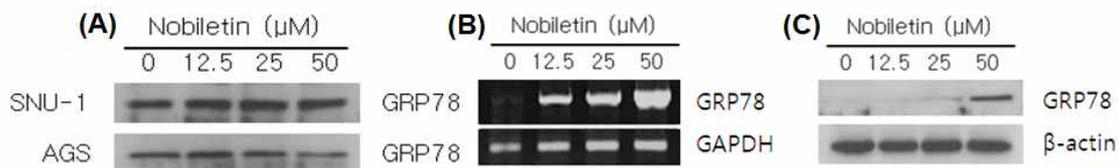


Figure. 78. RT-PCR and Western blot analysis of protein expression in gastric cancer cells. (A) Expression of GRP78 in SNU-16 cells after treatment of nobiletin was determined by

RT-PCR. (B) After 24 h, cell lysates were subjected to western blotting with antibodies against GRP78 and caspase-4 in SNU-16 cells. (C) Western blotting with GRP78 antibody against in another gastric cancer cells, SNU-1 and AGS.

마. Nobiletin에 의한 ER-stress와 세포 성장 관련 단백질들의 변화 확인

- Western blot을 통하여 nobiletin에 의한 SNU-16 세포에서의 ER-stress와 세포 성장과 관련된 단백질들의 발현 양상을 확인해본 결과, Akt와 mTOR의 인산화의 감소가 농도, 시간 의존적으로 감소함을 확인 할 수 있었다. 또한 ER-stress 관련 단백질들의 활성화를 통하여 nobiletin에 의한 apoptosis가 ER-stress를 통해 유도됨을 알 수 있었다 (Fig. 79).

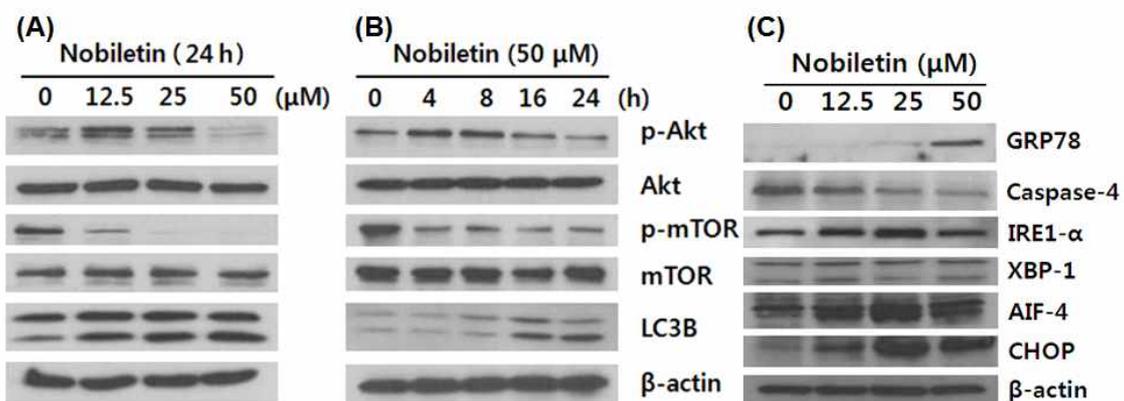


Figure. 79. Expression level of cell growth and ER-stress related proteins in SNU-16 cells. Cells were incubated with various concentration of nobiletin for 24 h (A and C) or 50 μ M of nobiletin with time-dependent manner (B). Proteins were separated by SDS-PAGE in a 10-15% polyacrylamide gel, transferred to a PVDF membrane and immuno-reacted with autophagy antibodies.

바. Nobiletin에 의해 유도된 autophagy 현상이 apoptosis에 미치는 영향 조사

- 또한 nobiletin에 의해 유도된 LC3 I에서 LC3 II로의 전환이 증가됨을 확인함으로써 nobiletin에 의해 autophagy가 유도 될 수 있음을 확인하여 (Fig. 80), nobiletin 처리시 autophagy 억제제인 chloroquine을 전 처리하여 MTT assay, cell cycle analysis, 그리고 western blot을 수행하였다. 그 결과 autophagy를 억제하였을 경우 nobiletin에 의한 세포성장 억제 증가 (Fig. 80A), sub-G1기의 증가 (Table 20), cleaved PARP의 증가 (Fig 80B)를 통하여 apoptosis가 더 민감하게 작용하는 것으로 확인되었다. 따라서 nobiletin에 의해 유도된 autophagy 현상은 apoptosis 현상을 억제하기 위한 세포보호의 기능으로서 작용함을 알 수 있었다.

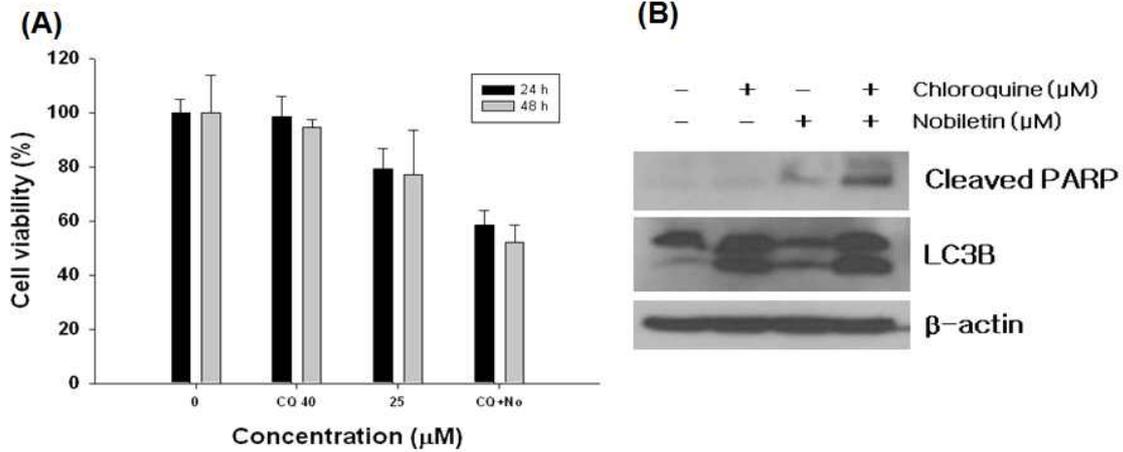


Figure. 80. Chloroquine inhibits autophagy and sensitizes SNU-16 cells to cytotoxic actions of nobiletin. (A) Cell viability was determined by MTT assay after treatment with different time (24 and 48 h) of nobiletin in the absence or presence of chloroquine (40 μM , pretreated for 2 h). (B) Western blot analysis of cleaved PARP expressions in cells treated with 25 μM nobiletin in the absence or presence of chloroquine (40 μM).

Table 20. Inhibition of autophagy enhance nobiletin-induced apoptosis.

Phage / (μM) (%)	Control	CQ 40	NO 25	CQ+ NO 25	NO 50	CQ+ NO 50
Sub-G1	7.93 \pm 4.67	9.61 \pm 2.84	17.16 \pm 2.91	23.03\pm3.07	30.91 \pm 7.40	39.81\pm11.50
G1	55.32 \pm 2.40	55.10 \pm 4.92	62.97 \pm 1.36	54.37 \pm 6.12	42.76 \pm 5.09	38.43 \pm 4.84
S	11.62 \pm 1.13	11.45 \pm 2.43	4.24 \pm 0.89	6.23 \pm 2.42	7.88 \pm 1.49	7.55 \pm 1.81
G2/M	25.47 \pm 5.33	24.17 \pm 2.74	15.79 \pm 3.32	16.62 \pm 3.60	18.76 \pm 2.25	14.55 \pm 5.68

제 7절 이예감 과피 초임계 추출물의 STAT3 활성화 저해 및 세포성장 억제

1. 이예감 과피 초임계 추출물에 의한 세포독성 및 세포변이 확인

가. 이예감 과피 추출물 (supercritical extracts of yeagam peel (SEYG)) 에 대한 다양한 암세포에서의 세포독성 측정

- 다발성 골수종 세포인 U266, 만성 골수성 백혈병 세포인 K562, 전립선 암세포인 DU145, 유방암 세포인 MDA-MB-231, 간암 세포인 HepG2 세포에 이예감의 과피 추출물(SEYG)을 처리한 결과, 모든 세포주에서 50~400 ug/mL 까지 농도 의존적인 세포독성을 보였으며, 특히 K562, DU145, HepG2 세포에서 가장 큰 세포독성을 나타냈다 (Fig. 81).

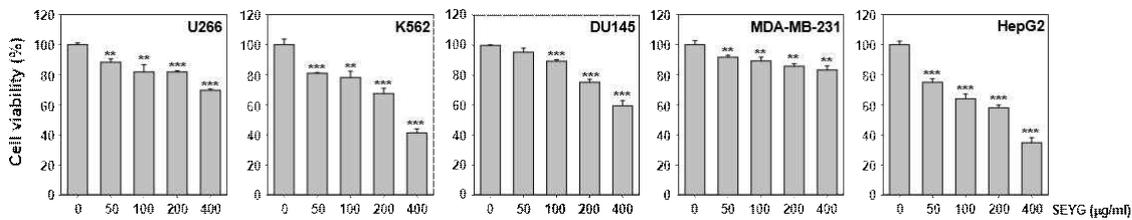


Figure. 81. U266, K562, DU145, MDA-MB-231, and HepG2 cells were incubated at 37 °C with various indicated concentrations of SEYG for 24 h, and the viable cells were assayed using the MTT reagent.

2. SEYG에 의한 암세포에서의 constitutive STAT3 활성화도 저해능 평가

가. SEYG에 의한 다양한 암세포에서의 constitutive STAT3 활성화도 저해능 평가

- 다섯 가지 암세포주가 constitutive STAT3 활성을 보이므로 우리는 SEYG 100 ug/mL 을 세포독성이 없는 6시간 처리한 후에 인산화 된 STAT3 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, DU145 전립선 암세포주에서 인산화 된 STAT3의 활성이 가장 많이 억제됨을 확인하였다 (Fig. 82).

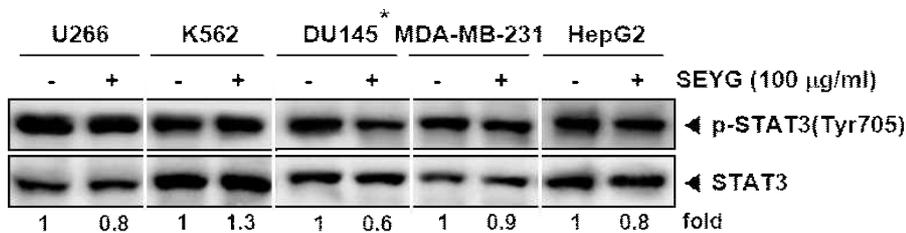


Figure. 82. Cells were incubated with the indicated concentrations of SEYG for 6 h. Whole-cell extracts were prepared, then equal amounts of lysates were analyzed by Western blot analysis using antibodies against p-STAT3, and STAT3. The results shown here are representative of three independent experiments.

나. SEYG에 의한 DU145 세포에서의 constitutive STAT3, JAK1/JAK2, Src 활성화도 저해

능 평가

- 다섯 가지 암세포 중 인산화 된 STAT3 활성 억제에 가장 큰 효과를 보인 DU145 세포에 대하여 시간별, 농도별 인산화 STAT3의 활성 변화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 200 ug/mL의 SEYG를 0-1-3-6 시간 처리하여 얻은 단백질과, 농도별 SEYG를 6 시간 반응하여 얻은 단백질을 웨스턴 블랏을 한 결과 시간 의존적, 농도 의존적인 인산화 STAT3의 감소 양상을 나타내었다. STAT3에 대한 upstream kinase인 JAK1과 JAK2에 대해서 SEYG에 의한 인산화 된 JAK1/JAK2의 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, 인산화 된 JAK1과 JAK2의 발현이 시간 의존적, 농도 의존적으로 억제됨을 보였다. 또 다른 STAT3에 대한 non-receptor upstream kinase중에 하나인 Src에 대해서 SEYG에 대한 인산화 된 Src의 웨스턴 블랏을 시도 하였다. 그 결과, SEYG에 의해 시간 의존적, 농도 의존적으로 인산화된 Src가 억제됨을 확인하였다 (Fig. 83).

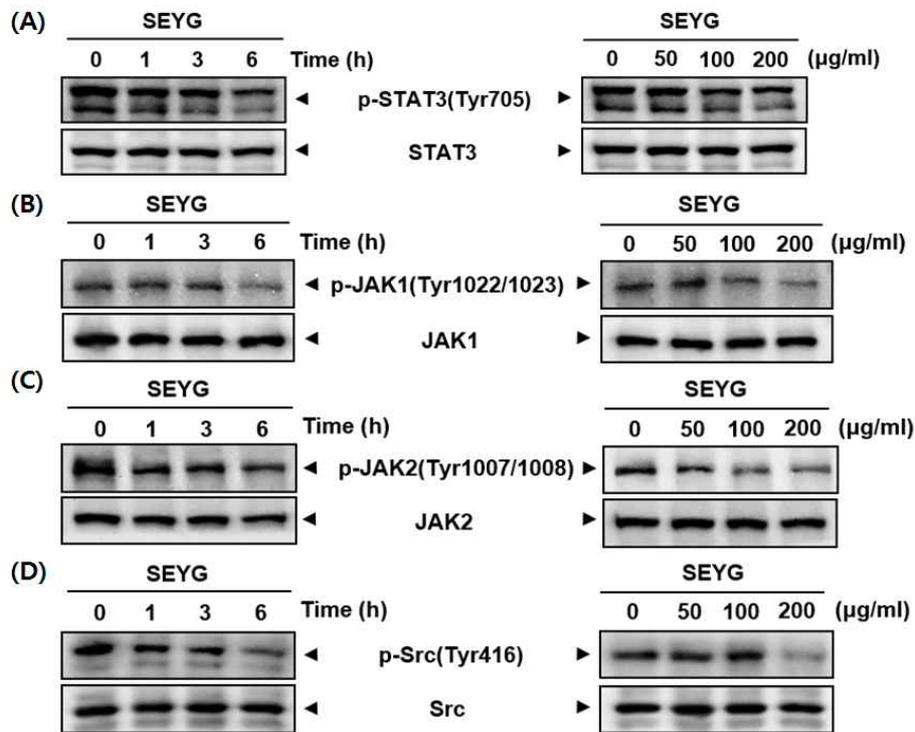


Figure. 83. DU145 cells (1×10^6 cells/well) were treated with various indicated concentrations of SEYG and time intervals. Then equal amounts of lysates were analyzed by Western blot analysis. Using antibodies against (A) p-STAT3(Tyr705), and STAT3, (B) p-JAK1(Tyr1022/1023), and JAK, (C) p-JAK2(Tyr1007/1008), and JAK2, (D) p-Src(Tyr416), and Src.

다. SEYG에 의한 DU145 세포에서의 STAT3의 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) 확인

- STAT3는 이합체화 반응을 통해 핵 안으로 이동한 후 DNA에 결합하여 유전자 전사를 조절하므로, STAT3의 DNA로의 결합 활성이 저해되는지 EMSA 실험 기법으로 평가한 결과, 농도 의존적으로 억제되는 양상을 나타내었다 (Fig. 84).

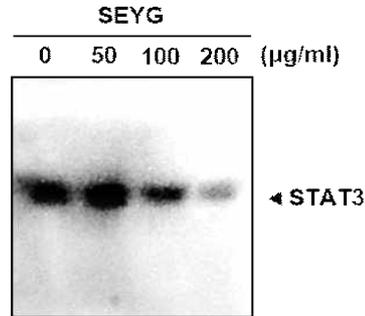


Figure. 84. SEYG suppresses STAT3 binding activity. DU145 cells were treated with various indicated concentrations of SEYG, analyzed for nuclear STAT3 levels by EMSA.

라. DU145 세포에서 SEYG에 의한 STAT3의 Nuclear pool의 감소 확인

- STAT3 이합체는 핵 안으로 이동하여 특정 목표 유전자의 전사를 조절하므로, STAT3의 핵으로의 이동이 저해되는지 면역세포화학법을 이용하여 측정한 결과, SEYG 미처리군에서는 핵 내에 존재하던 STAT3가 SEYG 처리군에서는 뚜렷하게 감소한 결과를 보였다 (Fig. 85).

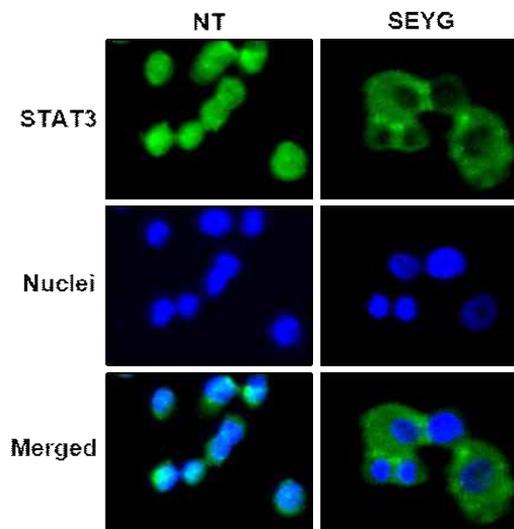


Figure. 85. SEYG causes the inhibition of translocation of STAT3 to the nucleus. After 6 h of SEYG treatment, the cells were fixed and permeabilized. STAT3 (green) was immunostained with rabbit anti-STAT3 followed by FITC-conjugated secondary antibodies and the nuclei (blue) were stained with DAPI. The third panels show the merged images of the first and second panels. The results shown are representative of two independent experiments.

3. DU145 세포에서 SEYG에 의한 세포 증식 억제 평가

- DU145 세포주에 SEYG를 200 ug/mL을 처리한 뒤, 실시간 세포 분석기를 이용하여 48시간 동안 세포 성장을 측정한 결과 아무것도 처리하지 않은 군의 세포 성장에 비해 SEYG 처리군의 세포 성장이 현저히 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 86).

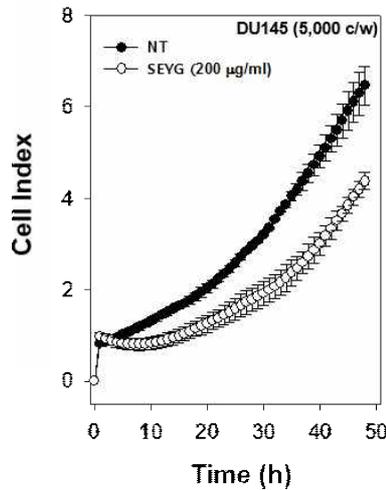


Figure. 86. Cell proliferation assay was performed using the Roche xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP instrument (Roche Diagnostics GmbH, Germany). After DU145 cells were seeded onto 96-well E-plates and continuously monitored using impedance technology.

가. DU145 세포에서 SEYG에 의한 세포생존과 세포주기에 관련된 단백질 발현 평가

- 전사인자인 STAT3의 활성화는 암세포의 생존에 꼭 필요한 단백질과 암세포의 세포주기에 관련된 단백질의 발현에 관여한다. 따라서 STAT3에 의해 조절되는 단백질 중 암세포 생존과 관련된 Bcl-2, Bcl-xL, Survivin, IAP-1/2의 발현을 조사하여 보았다. 그 결과, SEYG 처리군에서는 이들 단백질의 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 보였으며, 또 다른 STAT3에 의해서 조절되는 단백질 중 암세포 세포주기와 관련된 cyclin D1과 cyclin E의 발현 또한 SEYG 처리군에서 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. 이에 더하여 세포의 전이와, 신생 혈관형성에 관여하는 MMP-9, COX-2, VEGF 단백질의 발현도 농도 의존적 감소 양상을 보였다 (Fig. 87).

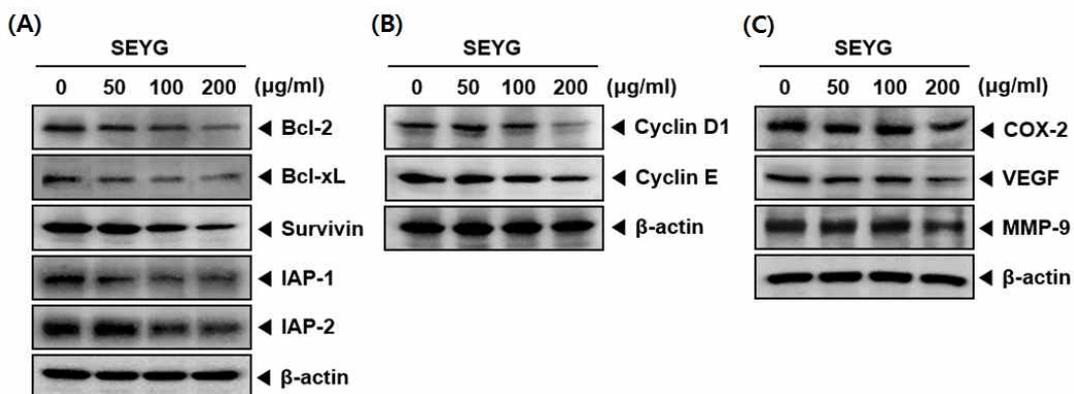


Figure. 87. DU145 cells were incubated with the indicated concentrations of SEYG for 24 h. Whole-cell extracts were prepared, and 20 ug of the whole-cell lysate was resolved by SDS-PAGE, electrotransferred to nitrocellulose membrane, sliced from the membrane based

on the molecular weight, and then probed with antibodies against (A) bcl-2, bcl-xL, survivin, IAP1/2, (B) cyclin D1, cyclin E, (C) COX-2, VEGF, and MMP-9 (C). The same blots were stripped and reprobbed with β -actin antibody to verify equal protein loading.

나. DU145 세포에서 SEYG에 의한 세포주기 평가 및 p53, p21 단백질의 발현 평가

- 유세포 분석기를 이용하여 SEYG에 의한 DU145 세포주의 세포주기 변화를 측정된 결과, 이 SEYG에 의해 농도 의존적으로 sub G1기의 축적을 확인을 할 수가 있었다. sub G1기의 축적은 apoptosis의 주된 특징 중 하나로 이 SEYG에 의한 세포독성과 세포증식의 억제 는 apoptosis의 유발과 관련되어 있음을 시사한다. 암세포의 성장 억제에 중요한 역할을 하는 p53과, 세포 주기의 진행을 억제 조절하는 p21 단백질의 발현에 SEYG가 미치는 영향을 웨스턴 블랏으로 평가한 결과 농도 의존적으로 이들 단백질의 발현이 증가함을 보였다 (Fig. 88).

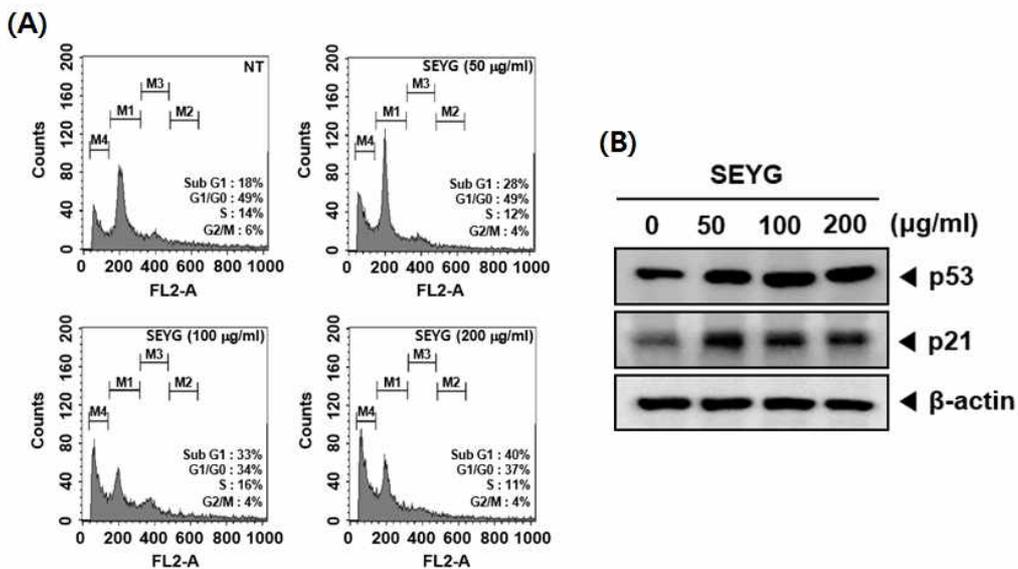


Figure. 88. (A) After DU145 cells were seeded onto 6-well plates, they were incubated with the indicated concentrations of SEYG for 24 h. Then, the cells were fixed and analyzed using a flow cytometry. (B) DU145 cells were incubated with the indicated concentrations of SEYG for 24 h. Whole-cell extracts were prepared, and 20 ug of the whole-cell lysate was resolved by SDS-PAGE, electrotransferred to nitrocellulose membrane, sliced from the membrane based on the molecular weight, and then probed with antibodies against p53, and p21. The same blots were stripped and reprobbed with β -actin antibody to verify equal protein loading.

다. SEYG에 의한 apoptosis 유발 평가

(1) Annexin V와 TUNEL assay를 통한 apoptosis 유발 확인

- Annexin V와 TUNEL 에세이를 통해서 DU145 전립선 암세포주에서 SEYG에 의한 apoptosis 유발 여부를 측정하였다. 그 결과 SEYG를 처리한 군에서는 농도 의존적으로 Annexin V positive 세포가 증가하였으며, TUNEL 에세이를 통한 DNA 절편 형성 측정에

서도 농도 의존적으로 DNA 절편이 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서, 이 두 가지 에세이를 통해 SEYG는 확실히 apoptosis를 유발함을 확인하였다 (Fig. 89).

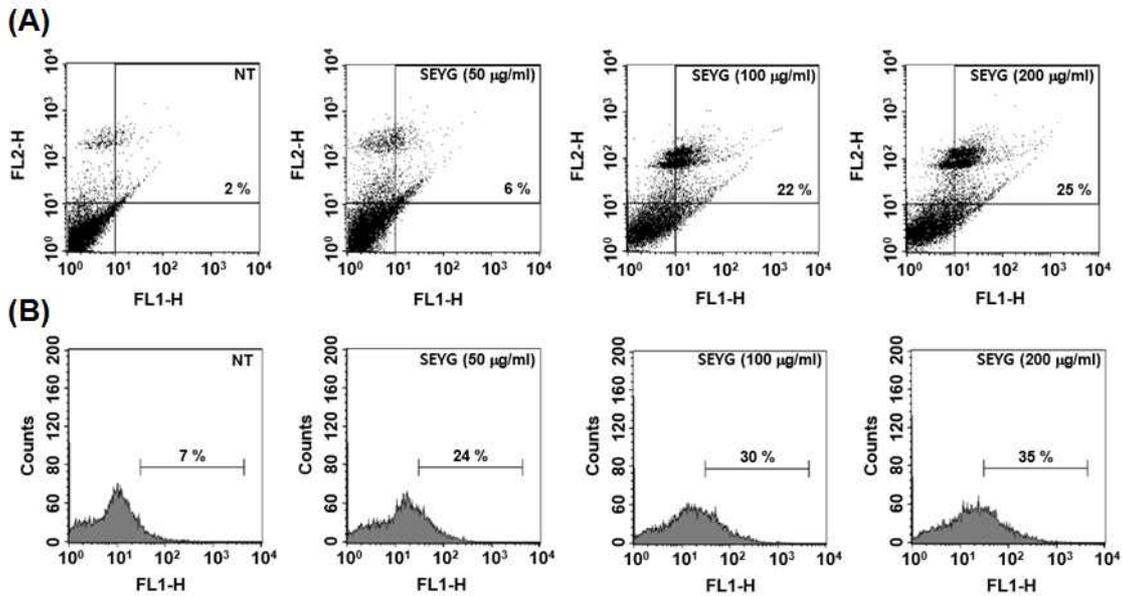


Figure. 89. (A) Cells were treated with indicated concentrations of SEYG for 24 h. Afterward, they were incubated with anti-annexin V antibody conjugated with FITC plus PI and analyzed with a flow cytometer for apoptotic effects. (B) Cells were treated with indicated concentrations of SEYG for 24 h. Cells were fixed, stained with TUNEL assay reagent, and then analyzed with flow cytometer.

라. SEYG에 의한 Caspase-3 활성화와 PARP Cleavage 평가

- apoptosis 유발에 중추적인 단백질인 Caspase-3의 활성화와 PARP cleavage의 웨스턴 블랏 확인을 통해 SEYG가 apoptosis 유발에 직접적인 영향을 미치는지 확인한 결과 농도 의존적으로 Caspase-3의 활성이 일어나며 PARP의 cleavage가 형성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 90).

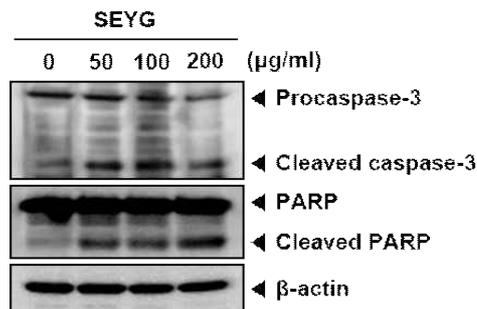


Figure. 90. After DU145 cells were seeded onto 6-well plates, they were treated with various indicated concentrations of SEYG for 24 h. Thereafter, equal amounts of lysates were analyzed by Western blot analysis using antibodies against caspase-3, and PARP. The same blots were stripped and reprobbed with β -actin antibody to verify equal protein loading.

4. DU145 이종이식 마우스 모델을 이용한 생체내(*in vivo*) 실험

가. DU145 이종이식 마우스 모델에서 SEYG에 의한 종양 형성 억제의 관찰

- 5주령 된 마우스를 일주일간 적응시킨 후 DU145 세포를 주입하여 생체 내에서 성장시킨 후, 일주일에 세 번씩 4주에 걸쳐 SEYG를 50, 200 mg/kg 으로 복강 주사하였다. 그 후 마우스에서 종양 조직을 적출하여 웨스턴 블랏과 면역조직화학 실험 기법을 이용하여 종양 성장 억제 능력을 평가하였다.
- 4주 동안 SEYG를 총 12회 복강 주사하여 종양의 성장 변화를 측정된 결과 처리 농도에 따라 종양 성장에 현저한 차이가 나타났음을 확인할 수 있었으며, 실험간 SEYG 주입으로 인한 발작이나 사망 등의 부작용은 발생하지 않았다 (Fig. 91).

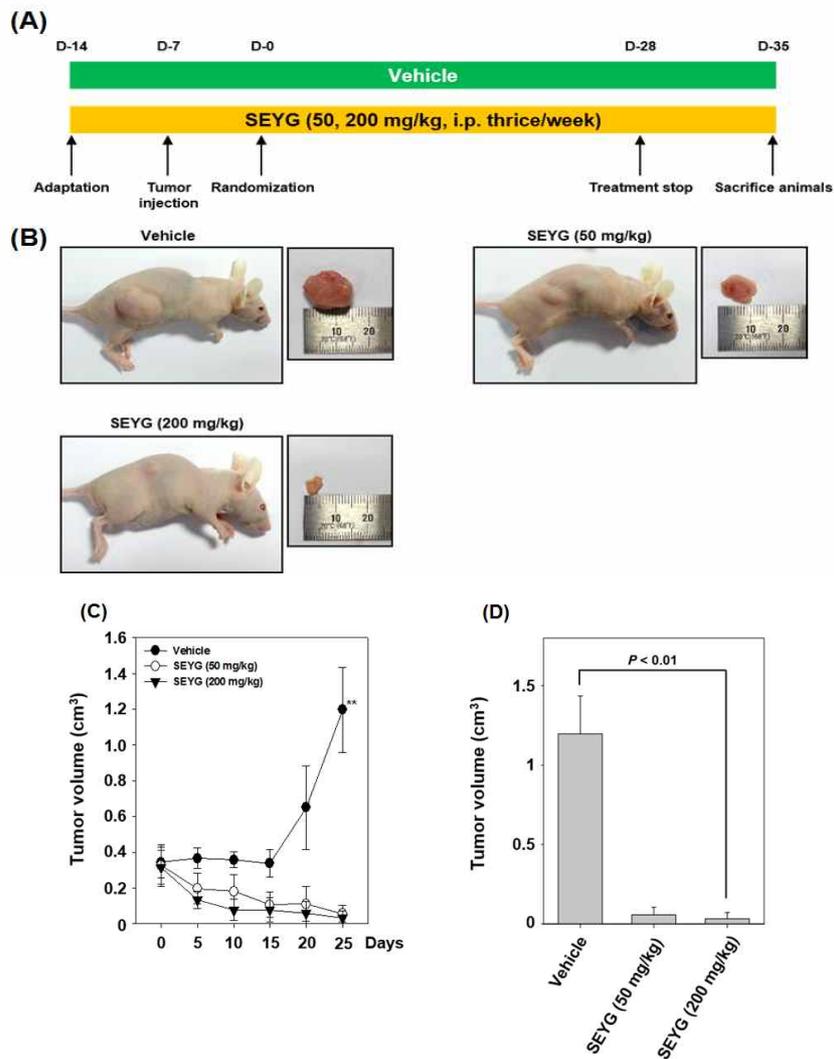


Figure. 91. (A) Schematic representation of experimental protocol described in “Materials and Methods.” DU145 cells (4×10^6 cells/mice) were injected subcutaneously into the right flank of the mice. The animals were randomized after 1 week of tumor cell injection into four groups based on tumor volume. Group I was given PBS (200 μ L, i.p. thrice/week), group II was given SEYG (50 mg/kg body weight, i.p. thrice/week), and group III was given SEYG (200 mg/kg body weight, i.p. thrice/week). (B) Necropsy photographs of mice

bearing subcutaneously implanted prostate tumors. (C) Tumor volumes in mice measured during the course of experiment and calculated using the formula $V = 4 / 3 \pi r^3$,** indicates $P < 0.01$. (D) Tumor volumes in mice measured on the last day of the experiment at autopsy using Vernier calipers and calculated using the formula $V = 4 / 3 \pi r^3$ (n=11). Columns, mean; bars, SE.

나. 이종이식 마우스 모델에서 적출한 종양 조직의 면역조직화학 실험

- DU145 이종이식 마우스 모델로부터 적출한 종양 조직을 파라핀으로 고정하여 얻은 절편을 이용하여, 세포 증식의 지표인 Ki67, 미세 혈관의 확장 정도를 관찰할 수 있는 CD31, apoptosis 유발에 중추적인 역할을 담당하는 cleaved caspase-3의 형성을 면역조직화학법으로 검증하였다. Ki67과 CD31은 감소하였으며, cleaved caspase-3는 증가하는 양상을 나타내었다. 이는 SEYG에 의해 종양 조직의 성장이 억제되었으며, apoptosis가 유발되었음을 입증하는 결과라고 판단할 수 있다 (Fig. 92).

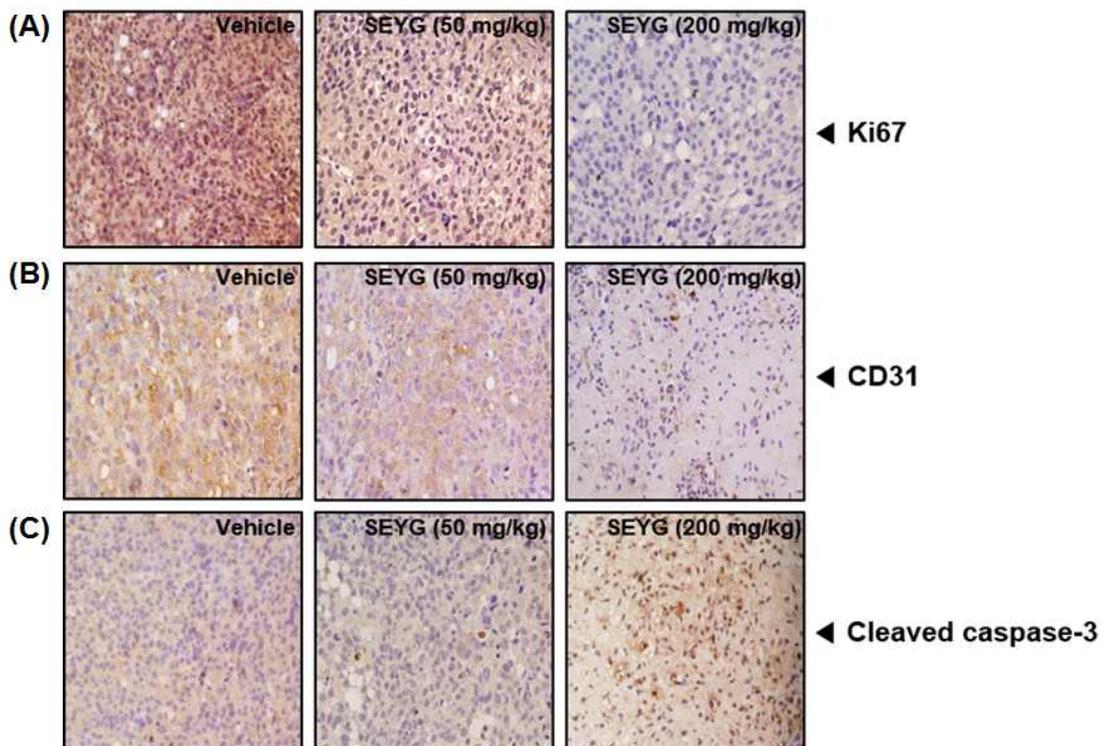


Figure. 92. (A) Immunohistochemical analysis of proliferation marker Ki-67+ cell indicates the inhibition of human prostate cancer cells proliferation by SEYG dose-dependent treated groups of animals. Samples from 3 animals in each treatment group were analyzed. (B) Immunohistochemical analysis of CD31 for microvessel density in prostate tumors indicates the inhibition of angiogenesis by SEYG dose-dependent treated groups of animals. Samples from 3 animals in each treatment group were analyzed. (C) Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3 in prostate tumors. Samples from 3 animals in each treatment group were analyzed.

다. 적출한 종양 조직의 constitutive STAT3/JAK1/JAK2/Src 활성화도 저해능 평가

- DU145 이종이식 마우스 모델로부터 적출한 종양 조직으로부터 얻은 단백질을 이용하여, 인산화 된 STAT3, JAK1, JAK2, Src의 웨스턴 블랏을 실시한 결과, 앞서 실시했던 세포내 실험과 동일하게 SEYG에 대해 농도 의존적으로 감소하는 양상을 확인할 수 있었다 (Fig. 93).

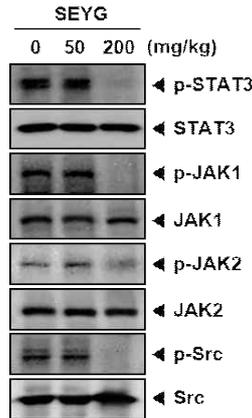


Figure. 93. Western blot analysis showed the inhibition of p-STAT3, p-JAK1, p-JAK2, and p-Src by SEYG in whole cell extracts from animal tissue. The same blots were stripped and reprobbed with STAT3, JAK1, JAK2, and Src antibody to verify equal protein loading.

라. 적출한 종양 조직의 세포생존과 세포주기에 관련된 단백질 및 p53, p21 단백질의 발현 평가

- 종양의 생존과 관련된 Bcl-2, Bcl-xL, Survivin, IAP-1/2와 세포주기와 성장에 관여하는 COX-2, cyclin D1, 세포의 전이, 신생 혈관형성에 관여하는 MMP-9, VEGF 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블랏으로 측정된 결과 세포내 실험의 결과와 동일하게 농도 의존적 감소 양상을 보였다. 종양 성장 억제에 관여하는 p53과 세포 주기의 진행을 억제 조절하는 p21 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블랏으로 측정된 결과, 농도 의존적으로 증가하는 현상을 보였으며, 이는 종양의 성장이 억제되고 있음을 증명한다 (Fig. 94).

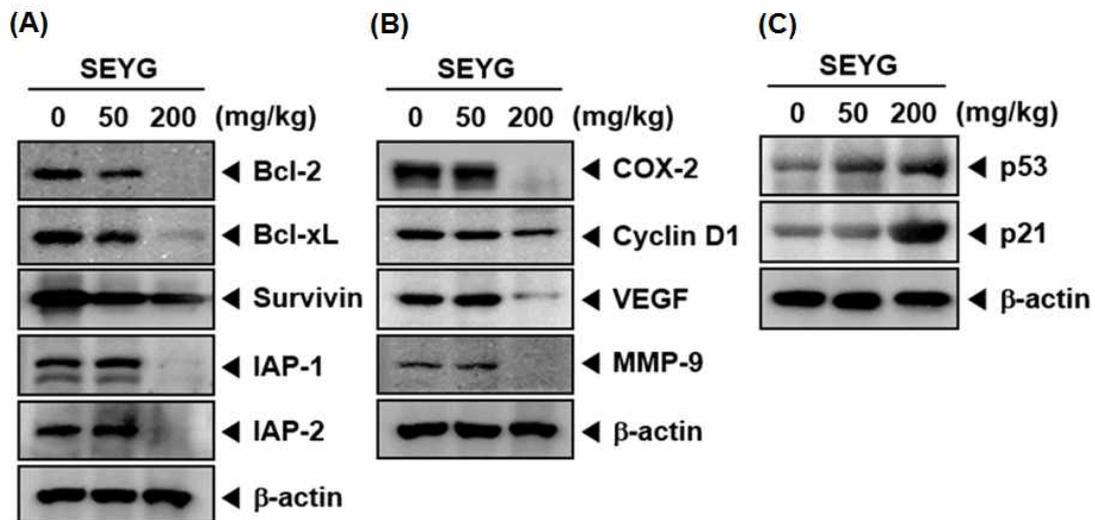


Figure. 94. Equal amounts of lysates were analyzed by Western blot analysis using

antibodies against bcl-2, bcl-xL, survivin, IAP-1, IAP-2 (A), COX-2, cyclin D1, VEGF, and MMP-9 (B), p53, and p21 (C). β -actin was used as a loading control. Western blotting samples from three mice in each group were analyzed and representative data are shown.

제 8절 팔삭 추출물의 항전이작용 및 기전 구명

1. 팔삭 과피 추출물에 의한 항전이 작용 확인

가. 팔삭 과피 추출물 (supercritical extracts of phalsak peel (SEPS)) 에 대한 다양한 암세포에서의 CXCR4 측정

- 암세포의 이동과 전이에 중요한 역할을 하는 CXC chemokine receptor-4 (CXCR4)의 발현에 SEPS가 미치는 영향을 다발성 골수종 세포인 U266, 만성 골수성 백혈병 세포인 K562, 전립선 암세포인 DU145, 유방암 세포인 MDA-MB-231, 간암 세포인 HepG2 세포에서 웨스턴 블랏 실험법으로 측정하였다. SEPS를 100 ug/mL 처리한 결과, DU145와 MDA-MB-231 세포에서 CXCR4의 두드러진 억제를 확인할 수 있었다 (Fig. 95).

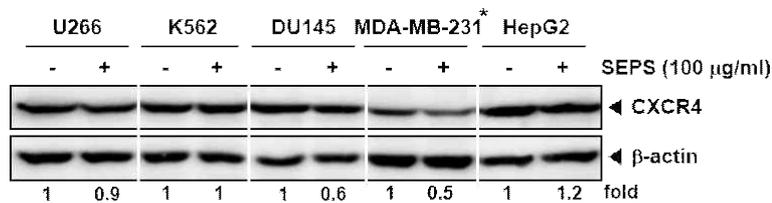


Figure. 95. U266, K562, DU145, MDA-MB-231, and HepG2 cells were incubated at 37 °C with 100 ug/mL of SEPS for 24 h. Whole-cell extracts were prepared, then equal amounts of lysates were analyzed by Western blot analysis using antibody against CXCR4. The same blots were stripped and reprobed with β -actin antibody to verify equal protein loading. The results shown here are representative of three independent experiments.

나. SEPS에 대한 다양한 암세포에서의 HER2/neu 측정

- 또한 CXCR4의 발현과 연관되어 있는 HER2/neu의 발현에 SEPS가 미치는 영향을 웨스턴 블랏 실험법으로 다섯 가지 세포주에서 확인한 결과, MDA-MB-231 세포주에서 가장 두드러진 억제를 나타내었다 (Fig. 96).

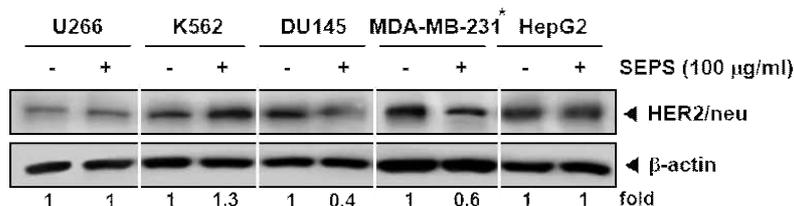


Figure. 96. Cells were incubated with the indicated concentrations of SEPS for 24 h. Whole-cell extracts were prepared, then equal amounts of lysates were analyzed by Western blot analysis using antibody against HER2/neu. The same blots were stripped and reprobed with β -actin antibody to verify equal protein loading. The results shown here are representative of three independent experiments.

다. MDA-MB-231 세포에서 SEPS에 의한 CXCR4의 측정

- 다섯 가지 암세포 중 CXCR4가 가장 크게 억제 된 MDA-MB-231 세포에 대해 SEPS

에 의한 농도별, 시간별 CXCR4의 활성 변화를 웨스턴 블랏으로 측정하였다. 세포 독성이 없는 농도 범위의 SEPS를 처리하여 얻은 단백질로 웨스턴 블랏한 결과 농도 의존적, 시간 의존적인 감소 양상을 보였다 (Fig. 97).

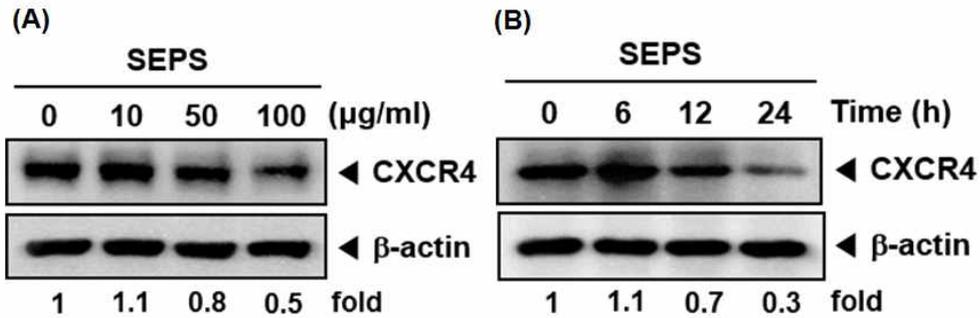


Figure. 97. (A) MDA-MB-231 cells were treated with various indicated concentrations of SEPS. Then equal amounts of lysates were analyzed by Western blot analysis using antibody against CXCR4. (B) MDA-MB-231 cells were treated with various indicated time intervals of SEPS. Then equal amounts of lysates were analyzed by Western blot analysis using antibody against CXCR4. The results shown here are representative of three independent experiments.

라. MDA-MB-231 세포에서 SEPS에 의한 MMP-9의 측정

- 세포막과 세포외 기질의 붕괴는 암세포의 침입과 전이를 위해서 필수적이며, MMP-9 (matrix metalloproteinases 9, 또는 gelatinase B)은 이런 작용을 하는 단백질로 알려져 있다. SEPS에 의한 MMP-9의 mRNA와 그 산물인 단백질의 수준 변화를 역전사 중합효소 연쇄반응, 웨스턴 블랏 실험 기법을 이용하여 측정하였으며, 그 결과 MMP-9의 농도 의존적 감소 현상을 확인할 수 있었다. 또한 젤라틴 자이모그래피를 이용한 직관적인 결과에서도 MMP-9은 SEPS에 농도 의존적인 감소 양상을 보였다 (Fig. 98).

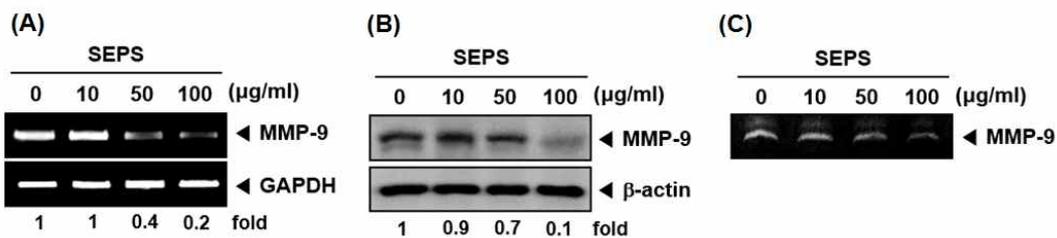


Figure. 98. Cells were incubated with SEPS (0, 10, 50 or 100 µg/mL) for 24 h. (A) MMP-9 gene expression was determined by RT-PCR. GAPDH was an internal control. The intensity of bands was normalized to the mRNA level of GAPDH. (B) MMP-9 protein levels were determined by Western blot analysis. β -actin was used as a loading control. (C) MMP-9 gelatinase activity was determined by gelatin zymography. The blots shown are representative of three independent experiments that had similar results.

마. CXCR4의 감소가 프로테아솜과 리소솜을 통한 저하가 아님을 증명

- 프로테아솜 억제제인 ALLN과 리소솜 억제제인 Chloroquine을 SEPS와 함께 처리하여

웨스턴 블랏으로 CXCR4의 발현을 비교한 결과 프로테아솜과 리소솜은 SEPS에 의한 CXCR4의 감소에 영향을 미치지 않음을 확인하였다 (Fig. 99).

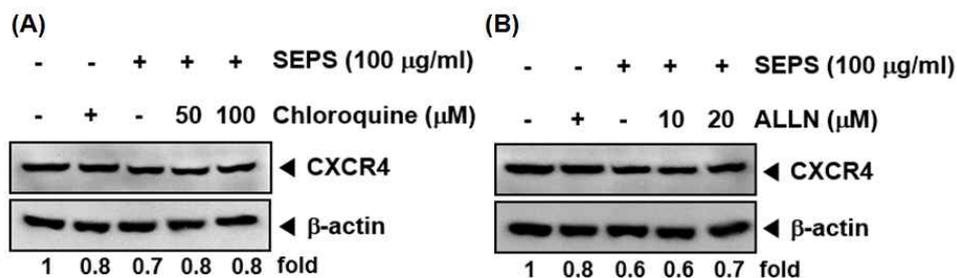


Figure. 99. SEPS inhibits CXCR4 by reducing the mRNA level and constitutive activation of NF- κ B. MDA-MB-231 cells were treated with the indicated concentrations of chloroquine (A) or N-acetyl-leucylleucyl-norleucinal (ALLN) (B) for 1 h at 37 $^{\circ}$ C, followed by treatment with 100 μ g/mL SEPS for 24 h. Whole-cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting with antibody against CXCR4. The same blots were stripped and reprobbed with β -actin antibody to show equal protein loading. The results shown are representative of three independent experiments.

바. SEPS에 의한 CXCR4의 전사 수준 측정

- 역전사 중합효소 연쇄반응 기법을 활용하여 CXCR4의 시간별 전사 수준 변화를 측정 한 결과 시간 의존적인 감소 양상을 나타내었다 (Fig. 100).

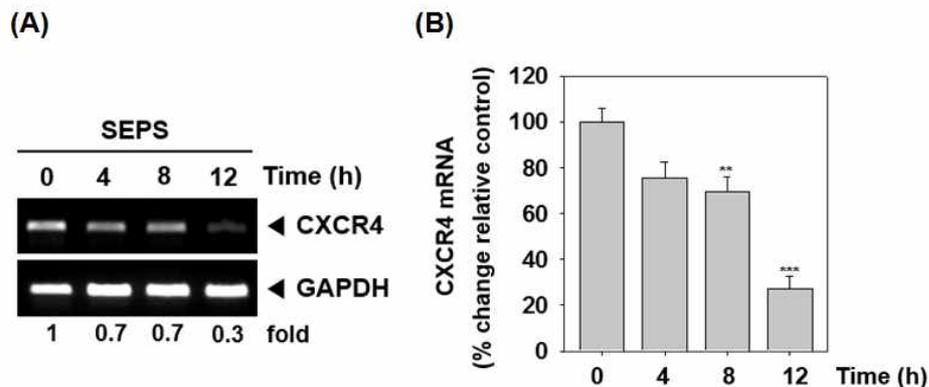


Figure. 100. (A) SEPS suppresses the expression of CXCR4 mRNA. Cells (1×10^6 cells/well) were treated with 100 μ g/mL SEPS for the indicated times. Total RNA was isolated and analyzed by an RT-PCR assay. GAPDH was used to show equal loading of total RNA. The results shown are representative of three independent experiments. (B) Graphs represent band intensities of CXCR4 mRNA. Data was expressed as mean \pm SD. **, $P < 0.01$ vs. control.

사. SEPS에 의한 constitutive NF- κ B의 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) 확인

- CXCR4의 프로모터 부위는 몇 가지의 NF- κ B 결합 부위를 가지는 것으로 알려져 있으며, NF- κ B의 활성 억제제 CXCR4에도 영향을 미칠 수 있으므로 NF- κ B의 DNA로의

결합 활성이 저해되는지 EMSA 실험 기법으로 평가한 결과, 농도 의존적으로 억제되는 양상을 나타내었으며 이는 SEPS에 의한 NF- κ B의 활성 억제가 CXCR4의 저해에도 연관되어 있음을 입증하는 것이다 (Fig. 101).

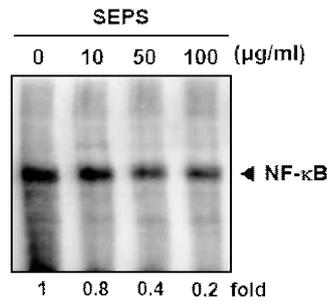


Figure. 101. SEPS inhibits constitutive NF- κ B activation in breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were incubated with SEPS at the indicated concentrations for 12 h. The nuclear extracts were assayed for NF- κ B activation by electrophoretic mobility shift assay. The results shown are representative of three independent experiments.

아. SEPS에 의한 CXCR4 프로모터 부위의 NF- κ B 결합 억제

- 염색질 면역침전 분석 방법을 이용하여 SEPS에 의한 CXCR4 프로모터 부위의 NF- κ B 결합 억제 능력을 확인한 결과 시간 의존적으로 억제되는 양상을 확인하였다 (Fig. 102).

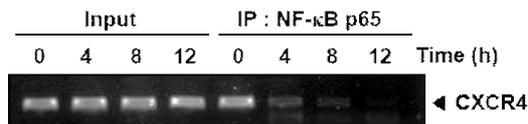


Figure. 102. SEPS inhibits binding of NF- κ B to the CXCR4 promoter. MDA-MB-231 cells were pretreated with 100 ug/mL SEPS for indicated times, and the proteins were cross-linked with DNA with formaldehyde and then subjected to ChIP assay with an anti-p65 antibody.

자. CXCL12에 의해 유도되는 세포 침입에 SEPS의 억제능 평가

- CXCL12는 유방암 세포에서 세포의 운동성과 이동을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 리간드이며 이를 이용하여 SEPS의 암세포 이동을 억제 하는지 확인할 수 있다. CXCL12에 의해 다량의 세포 이동이 유도되지만 SEPS는 그 이동을 억제하는 것을 세포내 침입 에세이 실험 기법으로 확인하였다. 실시간 세포 분석기를 이용하여 유방암 세포에서 자연적으로 일어나는 세포 침입에 SEPS의 억제능력을 24시간 동안 평가한 결과, 농도 의존적으로 그 억제 효과가 증대됨을 확인하였다 (Fig. 103).

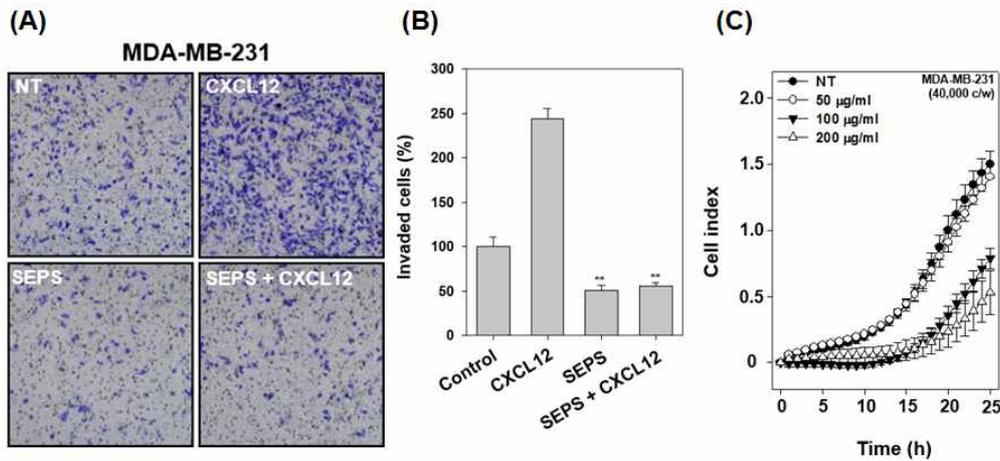


Figure. 103. (A) MDA-MB-231 cells were seeded in the top chamber of a Matrigel. After preincubation with or without SEPS (100 ug/mL) for 6 h, the transwell chambers were placed into 24-well plates with basal medium only or basal medium containing 100 ng/mL CXCL12. After incubation, the cell invasion assay was done. Randomly chosen fields were photographed under a light microscope at 100× magnification and invaded cells were counted. (B) Columns indicate standard average number of invaded cells, bars SE; ** $P < 0.01$. (C) Invasion assay was performed using the Roche xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP instrument (Roche Diagnostics GmbH, Germany). We tested MDA-MB-231 cells invasion activity in the matrigel-coated CIM (cellular invasion/migration)-Plate 16 with various indicated concentrations of SEPS.

2. 미성숙 초임계 팔삭 추출물에서의 생리활성 후보 물질들에 대한 항암 효능 탐색

- 1차년도 성숙과 초임계 추출물의 암세포사멸 효능과 2차년도 미성숙과 초임계추출물의 암세포사멸 효능을 종합적으로 분석해 본 결과, 팔삭 과피 추출물의 위암세포주 AGS 에 대한 세포사멸 효능이 탁월하였다. 팔삭 성숙 및 미성숙 과육과 과피의 GC/MS 성분을 각각 비교 분석한 후 성숙도와는 무관하게 팔삭 과피에만 존재하는 성분들 중에서 auraptene과 osthole을 항암 후보물질로 선택하였다.

가. 후보 물질인 auraptene과 osthole에 의한 세포독성 측정.

- MTT-assay를 통하여 human gastric cancer cell인 AGS, MKN-45, SNU-1, SNU-16 세포와 normal cell인 human embryonic kidney cell인 293T에 대해서 auraptene과 osthole에 대한 항암 효능을 측정한 결과, 48시간 처리 시 위암세포주들에 대한 세포 증식 억제 효과는 농도 의존적으로 나타났으며 그 중 SNU-1 세포에서 가장 효과적으로 나타났다 (Fig. 104A and B). 또한 후보 물질들이 일반세포에 대한 영향을 확인하기 위하여 정상 세포주인 embryonic kidney cell에 MTT-assay를 수행한 결과, 48 시간 처리 시 세포독성이 나타나지 않았다. 이를 통해 auraptene과 osthole이 암세포 특이적으로 위암세포에서 농도 의존적으로 세포증식 억제 효과가 나타남을 알 수 있었고, SNU-1 세포에서 가장 민감하게 반응하는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 이후의 모든 실험들은 SNU-1에 대하여 수행하였다.

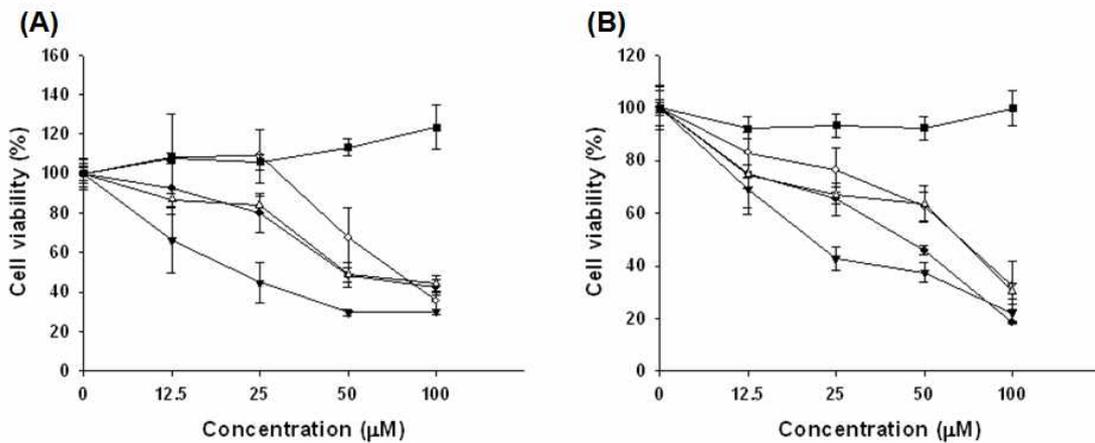


Figure. 104. Auraptene and osthole inhibits the cell proliferation on human gastric cancer cell lines (A: Auraptene, B: Osthole), (●: AGS, ○: MKN-45, ▼: SNU-1, △: SNU-16, ■: 293T).

나. Auraptene과 osthole에 의한 위암세포주 SNU-1에서의 apoptosis활성 확인.

(1) Hoechst 33342 staining을 통한 apoptotic body형성 확인.

- Hoechst33342 염색 시약으로 auraptene과 oshtole을 농도별로 처리하여 세포 모양을 현미경으로 관찰 하였을 때, auraptene (A)과 osthole (B) 모두에서 농도 의존적으로 apoptotic body 형성이 되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 105).

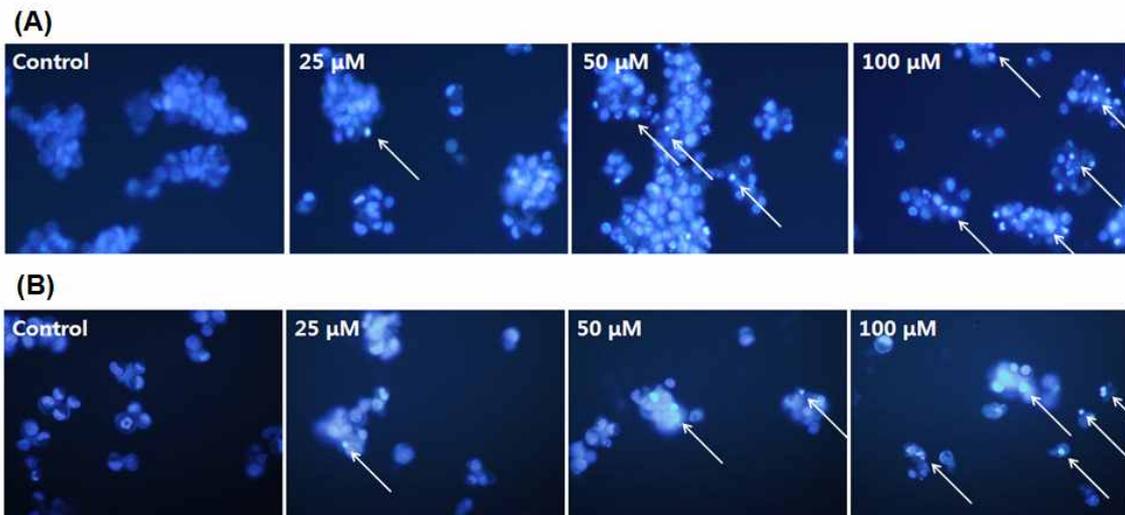


Figure. 105. Effect of auraptene and osthole on cell morphology (A: Auraptene, B: Osthole).

(2) 유세포분석기를 이용한 세포주기 변화 확인.

- Flow-cytometry를 통하여 SNU-1 세포에서의 세포주기 및 apoptosis의 유도를 확인 하기 위하여 sub-G1기를 확인한 결과 auraptene에서는 농도 의존적으로 G1기의 증가를 보이다가 100 μM에서 sub-G1기의 증가를 나타내었다. 하지만 osthole 같은 경우에는 G1기의 증가 없이 25 μM 농도에서부터 sub-G1기의 증가를 확인 할 수 있었다

(Table 22).

Table 22. Analysis of % of Sub G1 phase in the SNU-1 cells treated with auraptene and osthole.

Phase	Control	Auraptene (μM)			Osthole (μM)		
		25	50	100	25	50	100
Sub-G1	5.58	10.93	8.55	25.58	9.24	15.81	38.71
G1	54.96	62.00	79.45	48.31	55.29	55.72	40.04
S	13.80	10.58	5.04	10.22	12.51	10.99	8.06
G2/M	26.20	16.90	7.25	16.43	23.50	17.98	13.83

(3) Western blot을 통한 apoptosis 관련 단백질 발현 변화 확인.

- Western blot을 통하여 auraptene과 osthole 처리에 의한 SNU-1 세포에서의 apoptosis 관련 단백질들의 변화를 확인하였다. Auraptene과 osthole 모두 세포 성장과 관련된 Akt의 인산화는 증가되었지만 mTOR의 인산화의 감소를 확인하였으며 이에 대한 기작을 구명하기 위해 연구가 계속 진행 중이다. Akt의 인산화가 증가했음에도 불구하고 apoptosis 마커 단백질인 caspase-3의 활성화와 p21의 증가, cleaved PARP를 확인하였다. 위의 결과로 auraptene과 osthole 모두 SNU-1 세포에서 Akt의 인산화는 유도하였지만, 또한 apoptosis를 유도 할 수 있음을 확인하였다 (Fig. 106A and B).

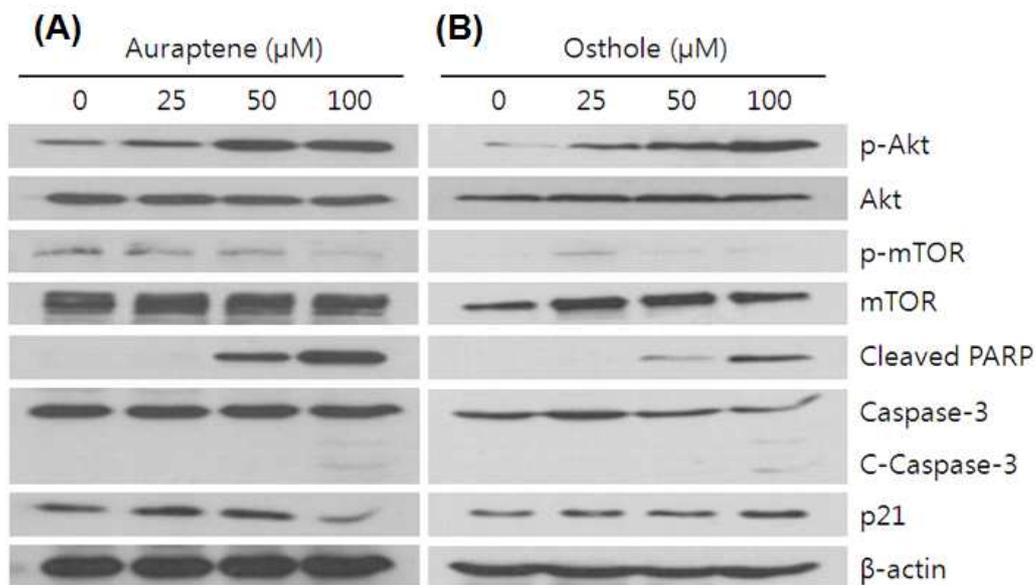


Figure. 106. Western blot analysis of apoptosis-related protein expression in auraptene and osthole-treated SNU-1 cells (A: Auraptene, B: Osthole).

(4) Auraptene에 의한 mTOR-AKT signaling의 조절 확인.

- Western blot을 수행한 결과 세포 성장과 관련된 단백질인 Akt의 인산화가 auraptene에 의해 증가되었지만 downstream에 있는 mTOR 및 mTOR 하위 단백질인 p70S6K의 인산화는 감소함으로써 auraptene이 mTOR을 선택적으로 억제함을 알 수 있었다 (Fig

107A). 이는 SNU-1 세포 특이적인 것으로 나타났으며 (Fig. 107B), Akt의 인산화 증가는 mTOR의 선택적인 억제제인 rapamycin에 의해 유도되는 것과 같은 경향을 보임으로써 auraptene 역시 rapamycin과 같이 mTOR을 선택적으로 억제하는 역할을 한다고 사료된다 (Fig. 107C).

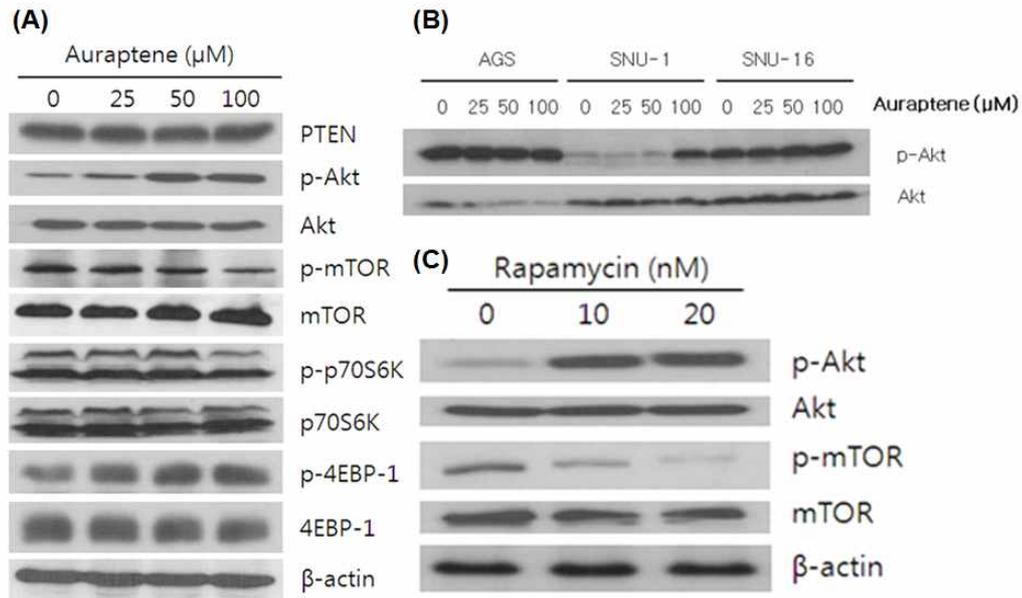


Figure. 107. Inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling by auraptene leads to an increase of Akt phosphorylation in SNU-1 cells. (A) Western blotting for Akt/mTOR related proteins using auraptene-treated lysates from SNU-1 cells. (B) Cells were treated with auraptene for 24 h in gastric cancer cells. (C) Cells were treated with rapamycin for 24 h in SNU-1 cells.

제 9절 팔삭과피와 구아바의 최적혼합물로부터 항염증 활성 및 기전 연구

1. 동물세포계(*in vitro*)를 이용한 OM의 항염증효능

가. OM의 산화질소 억제능 평가 (Nitric Oxide Assay)

- RAW264.7 대식세포에서 OM을 10, 30, 50 ug/mL 처리한 후 lipopolysaccharide (LPS)로 산화질소의 발생을 유도하였을 때 LPS로 유도된 산화질소의 생성이 농도 의존적으로 억제 되는 것을 확인하였다. 대식세포에서는 LPS를 외부 침입자로 간주하여, 이에 대해 독성을 갖는 방어물질인 산화질소를 iNOS을 통하여 발생하게 되는데, 이 산화질소의 억제는 항염증효과를 보이는 것으로 판단할 수 있다.

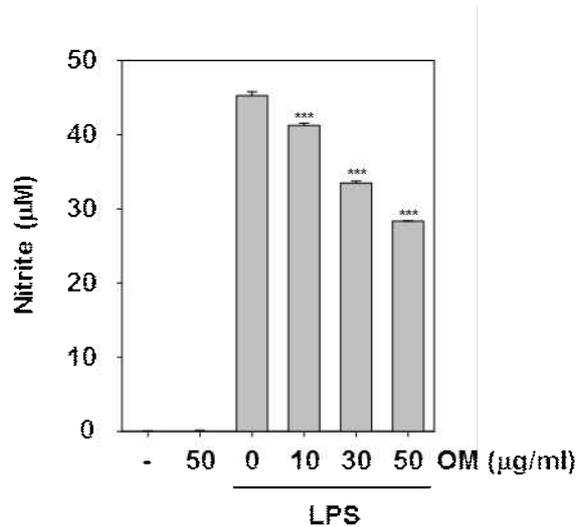


Figure. 108. The nitrite production was measured by the Griess reaction assay. Cells were pretreated with different concentrations of OM for 2 h and stimulated with LPS (1 ug/mL) for 22 h. The values obtained were compared with those of standard concentrations of sodium nitrite dissolved in RPMI 1640 medium, and the concentrations of nitrite in a conditioned media of sample treated cells were calculated. Data were obtained from three independent experiments and were expressed as means \pm SD. ***P < 0.001 indicates significant differences from the LPS treated group, ###P < 0.001 indicates significant differences from the unstimulated control group.

나. OM에 의한 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2의 유전자 발현 억제 평가

- RAW264.7 대식세포에서 OM이 iNOS, COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 웨스턴블랏을 하였다. LPS로 유도된 마크로파아지는 염증을 일으키게 되며, 이 물질에 의해 염증 유발 단백질로 알려진 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 증가하게 된다. LPS로 자극하지 않은 부분에서는 iNOS와 COX-2의 발현이 되지 않았으나, OM을 10, 30, 50 ug/mL 농도별로 처리한 후 LPS로 iNOS와 COX-2를 유도하였을 때, iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 위에서 수행하였던 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 mRNA의 발현 수준과 관련이 있는지 확인하기 위하여 RT-PCR

을 수행하였다. LPS로 자극하지 않은 부분에서는 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 되지 않았으나, OM을 10, 30, 50 ug/mL 농도별로 처리한 후 LPS로 iNOS와 COX-2를 유도하였을 때, mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

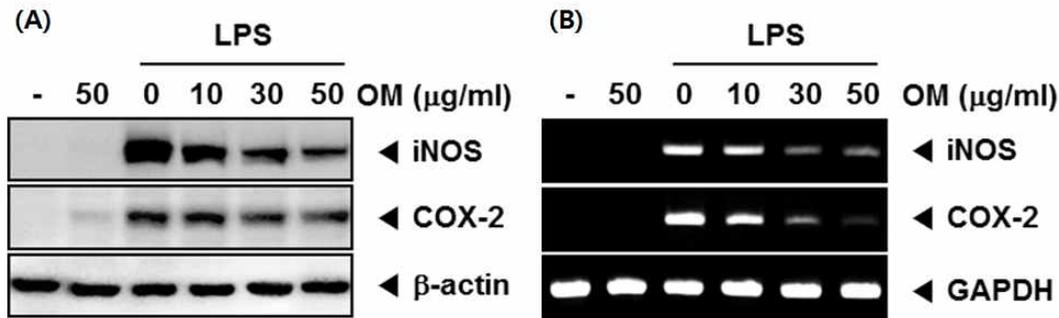


Figure. 108. Inhibition of iNOS and COX-2 expressions by OM in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were pretreated with different concentrations of OM for 2 h and stimulated with LPS (1 ug/mL) for 22 h. (A) Equal amounts of total proteins (25 ug/lane) were subjected to 8% (for iNOS) and 10% (for COX-2) SDS-PAGE, and the expressions of iNOS and COX-2 proteins were detected by Western blotting using specific anti iNOS and anti COX-2 antibodies. b-actin was used as a loading control. The blots shown are representative of three independent experiments that had similar results. (B) Total RNA was isolated, and iNOS and COX-2 mRNA expressions were examined by RT-PCR analysis. PCR of glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH, was performed to control for a similar initial cDNA content of the sample. The results shown are representative of the three independent experiments.

다. OM에 의한 LPS로 유도된 TNF- α , IL-6, PGE₂ 의 생성량 억제 효과 확인

- RAW264.7 대식세포에서 OM이 LPS에 의한 TNF- α , IL-6, PGE₂ 배지에 유리된 억제능을 확인하기 위하여 ELISA 방법을 이용하였다. 우선, LPS만을 처리한 세포군에서는 상당한 양의 TNF- α , IL-6, PGE₂ 배지로 분비되는 것을 확인하였고 OM을 전처리한 세포군에서는 농도 의존적으로 TNF- α , IL-6, PGE₂ 양이 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 OM이 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6, PGE₂ 양을 저해함으로써 항염증 효능을 가진다는 것을 확인하였다.

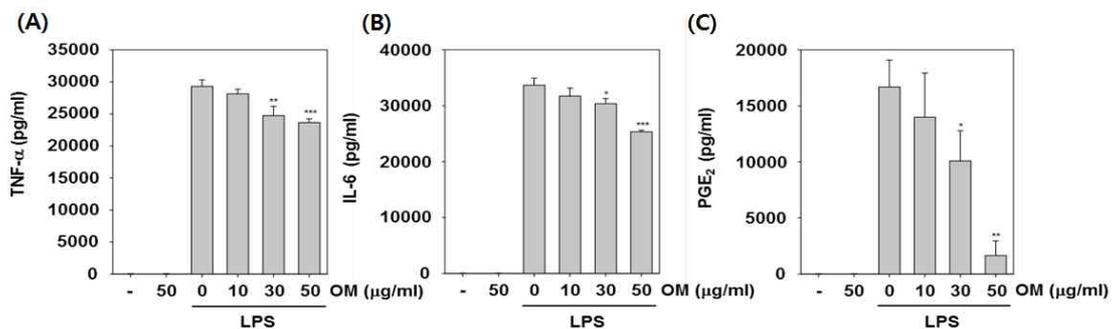


Figure. 109. Cells were pretreated with different concentrations of OM for 2 h and stimulated with LPS (1 ug/mL) for 22 h. (A) The amount of TNF- α release was

determined by a TNF- α antibody coated enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit. (B) The amount of IL-6 release was determined by an IL-6 antibody coated ELISA kit. (C) The amount of PGE2 release was determined by the mouse PGE2 ELISA kit. Data were obtained from three independent experiments and were expressed as means \pm SD. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 indicate significant differences from the LPS-treated group, ### P <0.001 indicate significant differences from the unstimulated control group.

라. OM에 의한 LPS로 유도된 ERK, p38, JNK의 인산화 반응 억제능 평가

- 염증인자 카이네아제인 MAPKs (ERK, p38, JNK)에 대한 인산화 정도가 억제 되는지를 평가 하였다. OM을 10, 30, 50 μ g/mL 농도별로 처리한 후 LPS로 ERK, p38, JNK를 유도 하였을 때, 농도의존적으로 인산화를 억제하는 것을 확인 할 수 있었다.

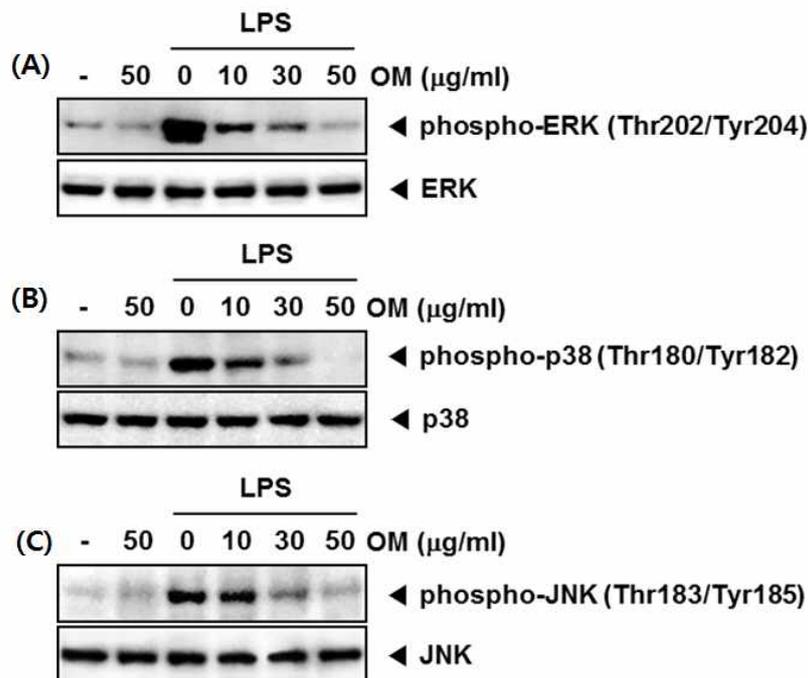


Figure. 110. (A, B, and C) The cells were pretreated with the indicated concentrations of OM for 2 h and stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 15 min; whole cell extracts were prepared, resolved by SDS-PAGE, and electrotransferred to a nitrocellulose membrane. After which Western blot analysis using phospho-specific anti-ERK, phospho-specific anti-p38, and phospho-specific anti-JNK antibodies was performed. The same membranes were reblotted with anti-ERK, anti-p38, and anti-JNK antibodies. The results shown are representative of the three independent experiments.

마. OM에 의한 LPS로 유도된 NF-kappaB와 AP-1의 활성화 억제 효과 확인

- 염증에 중요한 전사인자인 NF-kappaB는 염증반응에 있어서 iNOS와 COX-2을 조절하므로써 염증 반응을 매개한다고 잘 보고되었다. 이에 본 실험에서는 NF-kappaB의 Subunit인 Ikb α 와 p65의 인산화 정도를 평가하였다. 그 결과 LPS에 의한 Ikb α 의 분해는 억제되지 못하였다. Ikb α 의 분해의 억제는 p65의 전좌를 억제시키는 것으로 알려져 있다. 그래서 본 실험

험에서는 OM이 LPS에 의해 유도된 p65의 전좌를 억제하는지 평가하였다. OM은 LPS 유도된 p65의 전좌를 억제하지 못하였다. 따라서 OM은 LPS에 유도되는 NF-kappaB의 활성화에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 또 다른 염증인자 AP-1 (c-Jun, c-Fos)에 대한 인산화 정도가 억제되는 가를 평가를 하였다. 이 결과 OM이 LPS에 유도되는 c-Jun 과 c-Fos를 억제하지 못함을 확인 할 수 있었다. 위의 결과로 OM의 소염효과는 MAPKs 인산화 억제를 통해서 일어난다는 것을 확인 할 수 있었다.

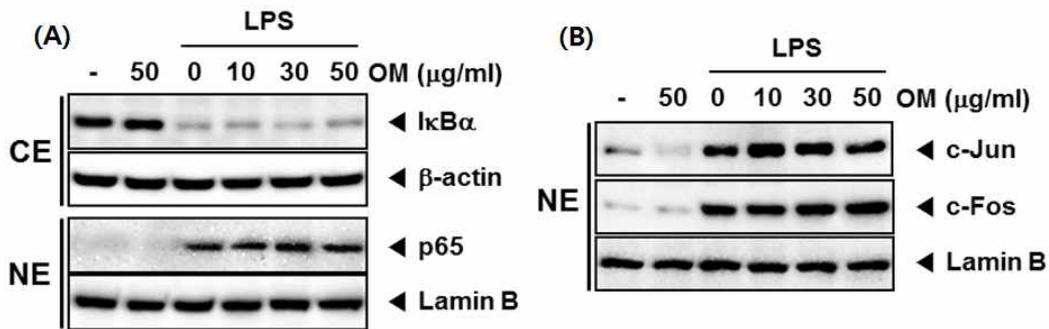


Figure. 111. (A) The Cells were pretreated with the indicated concentrations of OM for 2 h and stimulated with LPS (1 ug/mL) for 15 min; cytoplasmic and nuclear extracts were prepared resolved by SDS-PAGE, and electrotransferred to a nitrocellulose membrane. (A) After which western blot analyses using IkBa and anti-p65 antibody were performed. b-actin (cytoplasmic fraction) and Lamin B (nuclear fraction) proteins were used as a loading control. The results shown are representative of three independent experiments. (B) After which western blot analyses using c-Jun and c-Fos antibody were performed. Lamin B proteins were used as a loading control. The results shown are representative of three independent experiments.

2. 동물(*in vivo*)을 이용한 OM의 항염증효능

가. OM에 의한 동물모델에서 생존 효과

- 동물모델에서 LPS에 의한 충격으로부터 OM의 보호 효과를 평가하기 위해 우리는 치명적인 내독소 혈증과 마우스의 사망률에 미치는 영향을 모니터링 하였다. 독소를 주입 후의 생존률을 측정하였다. OM을 처리하지 않은 그룹은 LPS 주입 후 60시간에 10%의 생존률을 보였고 72시간 후에는 모두 사망하였다. 반면에 OM을 처리한 그룹은 LPS 주입 후 60시간에 70%의 생존률을 보였다.

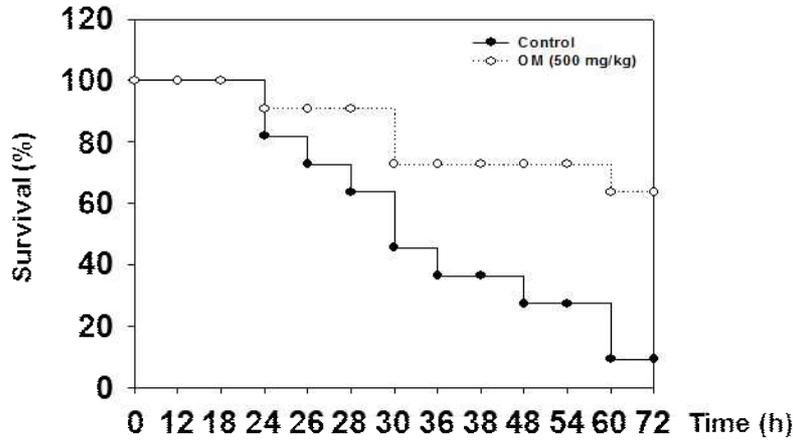


Figure. 112. BALB/c mice (ten per group) were injected intraperitoneally with 8 mg/kg of LPS. OM doses of 500 mg/kg were administered orally through an esophageal catheter at 24 h and 2 h before the LPS was injected. Survival was monitored during the next 72 h. The difference in the survival curves is significant, as calculated by log-rank test ($p = 0.004$).

나. 동물모델에서 OM에 의한 TNF- α , IL-6의 억제 효과

- 우리는 또한 마우스에 LPS 주입 후 혈중 농도에서 TNF- α 와 IL-6 생성량을 조사하였다. 대조군과 비교하였을 때 LPS로 충격받은 마우스에서 TNF- α 와 IL-6의 혈중 농도는 OM을 처리한 그룹에서 TNF- α , IL-6의 생성을 더 많이 억제시켰다.

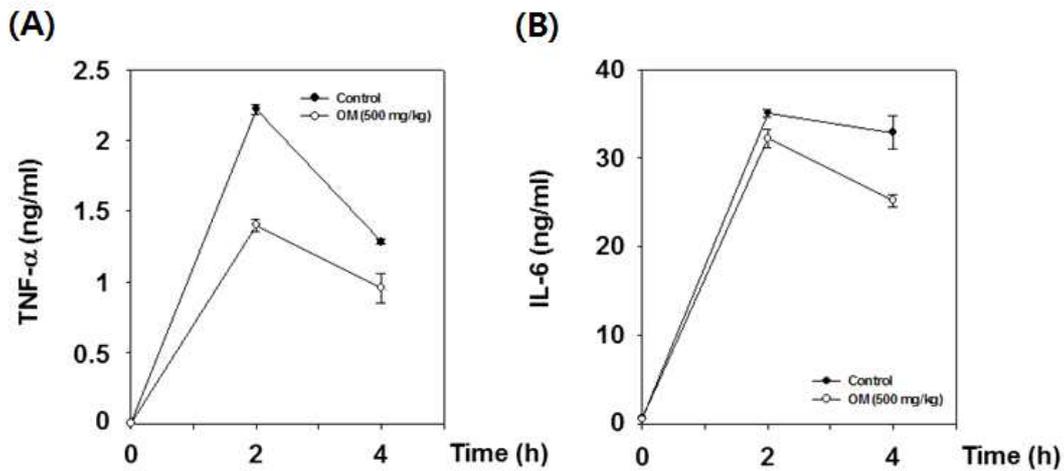


Figure. 113. OM doses of 500 mg/kg were administered orally through an esophageal catheter at 24 h and 2 h before the LPS was injected. Serum was collected at 2 h and 4 h after the LPS injection for the measurement of TNF- α (A) and IL-6 (B). TNF- α and IL-6 levels were measured using an ELISA kit. Data are the mean \pm SD from the data of three randomly chosen animals per group.

제 10절 천연물 혼합제재를 이용한 제품 개발

1. 약용농산물 4종 (사철쭉, 구아바, 포공영, 황련) 중 항염증 효과가 우수한 부원료 선정

가. 재료 및 방법

(1) 추출물의 제조

- 본 연구에 사용한 포공영, 인진호, 황련은 경희한약에서 구입하여 사용하였으며 구아바 잎은 제주대학교에서 제공받아 사용하였다. 2011년 1월 31일에 채취하여 건조된 포공영 (*Taraxacum platycarpum*), 2010년 8월 13일에 채취하여 건조된 인진호 (*Artemisia capillaris* Thumb) 및 2011년 1월 27일에 채취하여 건조된 황련 (*Coptis chinensis*)을 각각 분쇄기를 사용하여 마쇄한 후 20 mesh체를 통과시켜 추출하였고 구아바 잎 (*Psidium guajava*)은 2011년 5월 2일에 채취하여 건조된 것을 분쇄기를 사용하여 마쇄한 후 20 mesh체를 통과시켜 추출하였다. 인진호, 구아바, 포공영, 황련 각각 20 g을 20배량의 70% 에탄올을 첨가하여 30 °C에서 6시간동안 환류추출한 후 여과하여 얻어진 추출액은 감압농축기 (rotary vacuum evaporator)로 45 °C이하에서 농축하여 동결 건조하였다.

(2) MTT assay

- 시료의 세포독성을 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide) assay를 실시하였다. RAW 264.7 cells을 1×10^5 cells/well로 96 well plate에 분주한 후 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 시료를 농도별 (0, 5, 10, 30, 50 µg/mL)로 전 처리한 후 24시간동안 반응시켰다.

(3) NO 생성량 측정

- NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cells를 1×10^5 cells/well로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 구아바, 인진호, 황련 및 포공영 에탄올 추출물을 5, 10 및 30 µg/mL 농도로 세포에 전 처리하여 2시간동안 배양한 후 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 µL를 96 well plate에 취하고, 여기에 동량의 Griess reagent를 넣어 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

(4) PGE₂ 생성량 측정

- RAW 264.7 cells를 6 well plate에 1×10^6 cells/mL의 세포수가 되도록 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 RPMI 1640배지로 교환 후 구아바, 인진호, 황련 및 포공영 에탄올 추출물을 5, 10 및 30 µg/mL 농도로 세포에 전 처리하여 2시간동안 배양한 후 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 5,000 rpm에서 3분 동안 원심 분리하여 분리된 상층액을 PGE₂ enzyme immune assay (EIA) kit (R&D Systems, Abington, UK)을 사용하여 PGE₂ 양을 측정하였다.

(5) 수율

- 각 조건별로 추출한 시료의 총 추출수율은 항량을 구한 수기에 추출액 10 mL을 취하여 105 °C에서 증발 건조시킨 후 그 무게를 측정하였으며, 추출물 조제에 사용된 원료량

(건물량)에 대한 백분율로써 추출 수율 (% , total extract yield)을 나타내었다.

(6) 총 폴리페놀 함량

- 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다. 각 추출물 500 μ L에 1N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μ L 및 2% Na_2CO_3 10 mL을 가하고 혼합한 다음 실온에서 1시간 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로는 gallic acid를 사용하여 구한 검량곡선으로부터 시료 중의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

(7) 통계처리

- 본 연구의 실험에서 얻어진 결과는 SPSS Statistics 18.0 Network Version (on release 18.0.1 of PASW Statistics)을 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였으며 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 수율

- 산업적 측면에서 볼 때 천연물의 추출수율 증가는 부가 가치적 측면에서 매우 중요한 요소로 작용한다. 본 실험에서 사용한 구아바, 인진호, 황련 및 포공영을 30 °C에서 70% 에탄올로 6시간 추출한 추출물들의 수율은 Fig. 114에 나타낸 바와 같다. 구아바 잎의 경우 $39.65 \pm 1.59\%$ 로 가장 높은 수율을 나타냈으며, 포공영 추출물의 경우 $25.52 \pm 1.87\%$, 황련 및 인진호는 각각 $23.52 \pm 1.63\%$, $20.72 \pm 2.45\%$ 로 나타났다. 구아바 잎의 추출물 수율은 포공영, 황련 및 인진호 추출물보다 유의적으로 높았으며 ($p < 0.05$), 포공영 추출물의 수율은 인진호 추출물보다 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 황련 추출물의 수율은 인진호 추출물보다 높았으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 따라서 수율에서 구아바 잎 추출물이 가장 높게 나타났으며 포공영, 황련, 인진호 순으로 높게 나타났다.

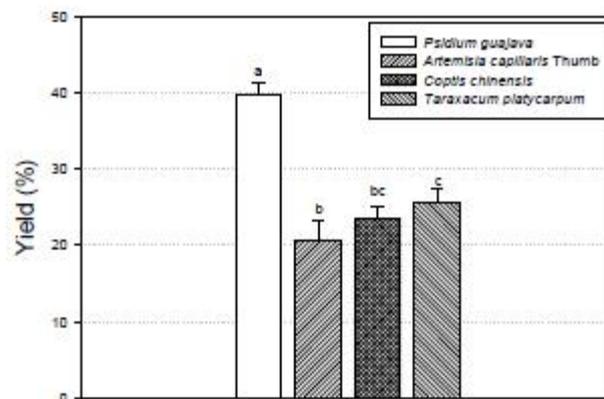


Figure. 114. Yield of ethanolic extracts from *Psidium guajava*, *Artemisia capillaris* Thunb, *Coptis chinensis* and *Taraxacum platycarpum*. Data are presented as mean±standard deviation(n=3). Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

(2) 총페놀성 화합물

- 식물계에 널리 분포되어 있는 총 페놀성 화합물은 단백질 또는 효소 단백질, 기타 거대 분자들과 결합하는 성질 및 2가 금속이온과의 결합력으로 인하여 free radical을 제거함으로써 산화를 억제하여 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막아 항암, 항균, 노화 방지 및 심장질환을 예방하는 등의 생리활성 물질로 알려져 있다. 총 페놀성 화합물은 높은 항산화 효과를 가지는 것으로 알려져 있어 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에 활용되고 있다. 본 연구에서는 구아바, 인진호, 황련 및 포공영을 30 °C에서 70% 에탄올로 6시간동안 추출한 추출물들의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과는 구아바 잎의 경우 총 폴리페놀 함량이 426.84 mg/100g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 인진호 추출물의 경우 154.42 mg/100g, 황련과 포공영은 각각 122.04 mg/100g, 41.73 mg/100g으로 나타났다. 약용농산물 4종에 대한 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과, 구아바 잎의 추출물에서 가장 높은 총 폴리페놀 함량이 나타났으며 이는 인진호, 황련 및 포공영의 추출물에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 인진호 추출물의 총 폴리페놀 함량

은 황련 및 포공영 추출물보다 유의적으로 높게 나타났으며 약용식물 4종중에서 총 폴리페놀 함량은 구아바 잎과 인진호 추출물에서 높게 나타났으며 이를 통해 천연 항산화제로의 사용 가능성과 노화관련 건강기능식품 소재 개발 가능성 또한 있을 것으로 사료된다.

(3) 세포생존율의 변화

- 약용농산물 4종(구아바, 인진호, 포공영, 황련)의 추출물이 마우스 대식세포인 RAW 264.7의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 각 추출물들을 농도별 (5, 10, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24시간 동안 처리한 결과는 Fig. 115와 같았다. 구아바 추출물을 농도별 (5, 10, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 세포생존율은 각각 $97.24 \pm 4.22\%$, $94.26 \pm 2.46\%$, $90.89 \pm 4.08\%$ 및 $78.19 \pm 3.49\%$ 이었으며 인진호 추출물을 농도별 (5, 10, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 세포에서는 각각 $90.03 \pm 0.72\%$, $86.74 \pm 4.16\%$, $84.43 \pm 4.16\%$ 및 $77.85 \pm 4.72\%$ 의 세포생존율을 보였다. 포공영 추출물을 농도별 (5, 10, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 처리한 세포에서는 각각 $98.03 \pm 8.20\%$, $89.50 \pm 2.36\%$, $88.62 \pm 6.79\%$ 및 $86.95 \pm 6.38\%$ 의 생존율이 나타났다. 황련의 경우 각각 $78.91 \pm 8.67\%$, $81.27 \pm 2.08\%$, $64.87 \pm 2.15\%$ 및 $56.10 \pm 1.10\%$ 로 농도에 따른 세포생존율에 유의적인 감소가 나타났다. 황련의 경우 유독성분인 버버린이 함유되어 있어 식품공정상 식품에 사용할 수 없는 원료의 목록에 등재되어 있으며 소화기가 약한 사람은 복용을 피해야 한다고 보고하고 있다.

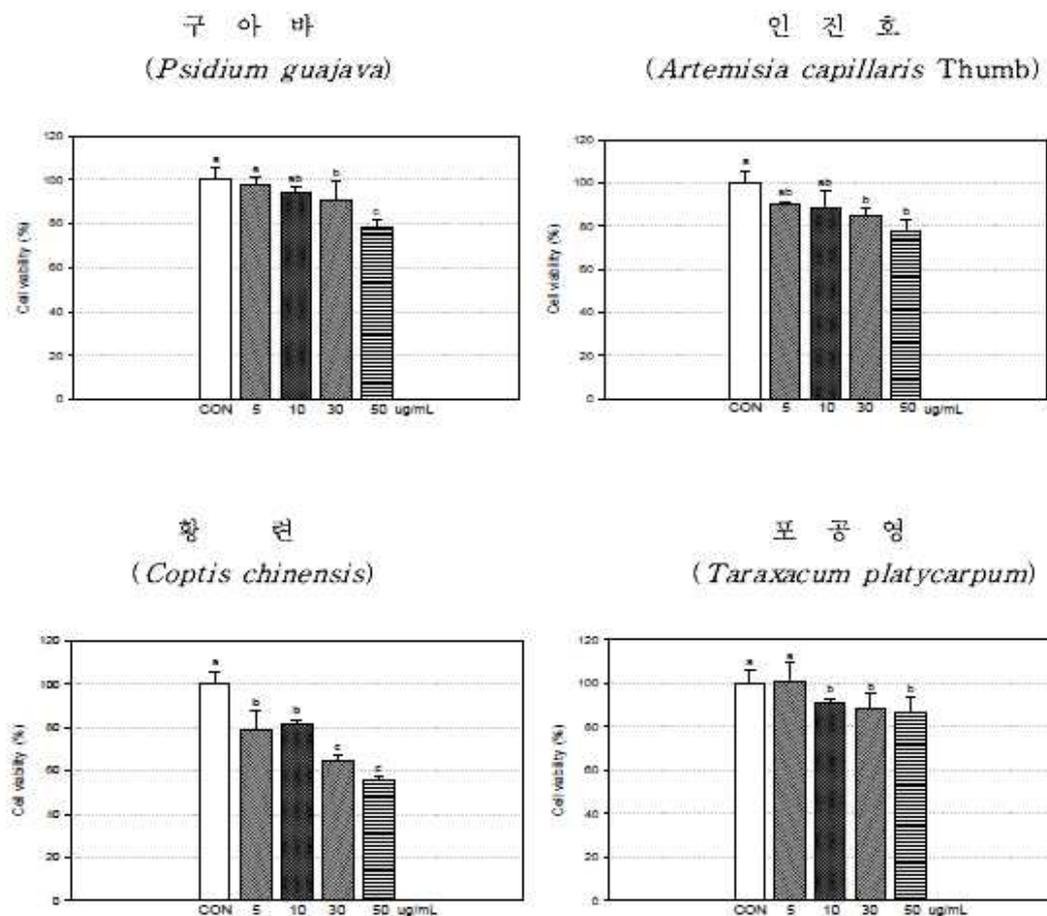


Figure. 115. Effect of ethanolic extracts from *Psidium guajava*, *Artemisia capillaris* Thumb, *Coptis chinensis* and *Taraxacum platycarpum* on cell viability in RAW 264.7. Each column represents the mean±standard deviation(n=3). Values with different letters are significantly different ($p<0.05$).

(4) NO 생성에 미치는 영향

- 약용농산물 4종 (구아바, 인진호, 포공영, 황련) 추출물의 항염증활성을 알아보기 위하여 면역 유물질인 LPS를 RAW 264.7 세포에 처리하여 분비되는 NO의 양을 측정 한 결과는 Fig. 116와 같았다. 아무런 약물을 처리하지 않고 LPS로만 자극한 대조군이 생성한 NO의 양은 $48.13 \pm 0.62 \mu\text{M}$ 이었으나 구아바 추출물을 농도별로 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 NO의 생성이 억제되었다. 구아바 추출물을 농도별 (5, 10, 30 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 후 LPS로 자극한 실험군의 NO 생성량은 각각 42.46 ± 0.59 , 35.63 ± 0.26 및 $22.82 \pm 0.10 \mu\text{M}$ 로 유의한 억제작용을 나타내었으며 ($p<0.05$) 인진호의 NO 생성량은 각각 43.46 ± 0.36 , 37.41 ± 0.31 및 $26.37 \pm 0.21 \mu\text{M}$ 로 농도별 유의적 감소가 나타났다 ($p<0.05$). 황련 추출물을 농도별 (5, 10, 30 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 실험군의 NO 생성량은 각각 43.13 ± 0.77 , 36.32 ± 0.36 및 $26.37 \pm 0.22 \mu\text{M}$ 로 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였으며 ($p<0.05$) 포공영 추출물의 경우 NO 생성량은 각각 44.51 ± 0.10 , 42.49 ± 0.18 및 $30.09 \pm 0.41 \mu\text{M}$ 로 통계학적으로 유의성 있는 감소를 나타냈다 ($p<0.05$). RAW 264.7 세포에 약용농산물 4종의 추출물을 30 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 각각 처리한 후 LPS로 염증반응을 유도하였을 때 생성되는 NO의 억제율은 아무런 약물을 처리하지 않고 LPS로만 자극한 대조군에 비해 구아바 추출물은 52.58% 이었으며 인진호, 황련 및 포공영은 각각 45.21%, 45.21%, 37.47%로 나타나 약용농산물 4종 중 구아바 추출물이 NO의 생성 억제 작용이 가장 뛰어남을 알 수 있었다. 이로써 항염증 효과에 뛰어난 부재료로서 구아바와 인진호 추출물을 선발하여 항염증 활성 증진을 위한 최적 추출조건을 확립하고자 한다. 황련의 경우 인진호와 유사한 NO 생성 억제율이 나타났으나 Fig. 124에 나타난 바와 같이 낮은 세포생존율을 보이며 유독성분이 버버린이 함유되어 식품공전상 식품에 사용할 수 없는 원료의 목록에 등재되어 있다는 점을 감안하여 항염증 활성 증진을 위한 부원료 재료 선발에 배제되었다.

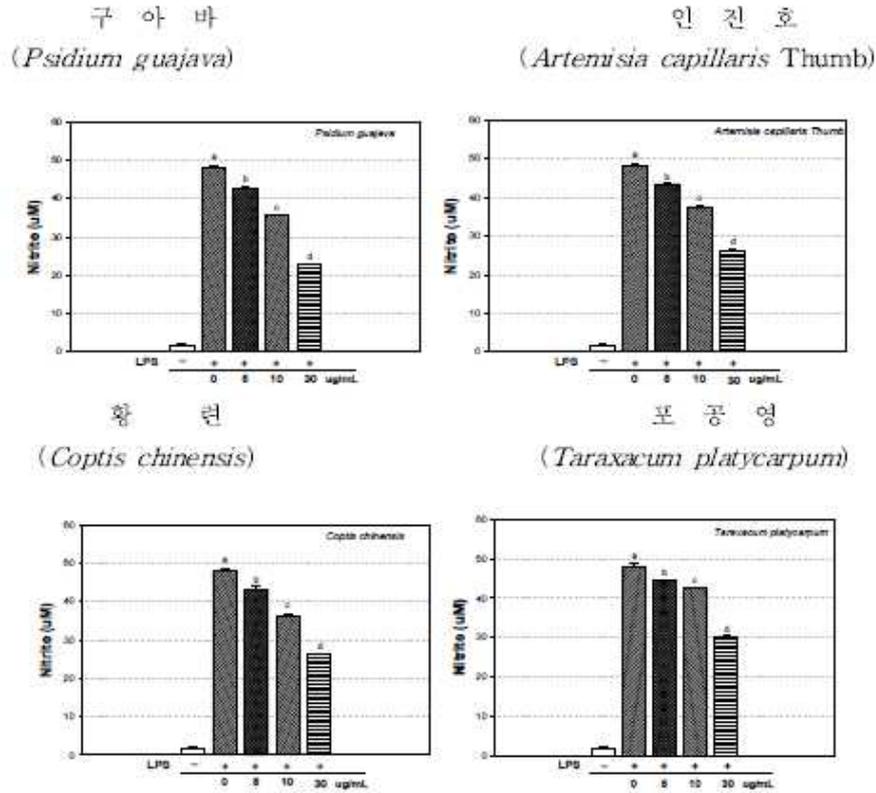


Figure. 116. Effect of ethanolic extracts from *Psidium guajava*, *Artemisia capillaris* Thumb, *Coptis chinensis* and *Taraxacum platycarpum* on NO production in LPS- induced RAW 264.7 cells for 24 hr incubation. Each column represents the mean±standard deviation(n=3). Values with different letters are significantly different ($p<0.05$).

(5) PGE₂ 생성에 미치는 영향

- 약용농산물 4종 (구아바, 인진호, 포공영, 황련) 추출물의 PGE₂ 생성 억제 효과를 알아보려고 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도시키고 약용농산물 4종 추출물을 각각 처리하여 PGE₂ 생성량을 측정된 결과는 Fig. 117와 같다. 아무런 약물을 처리하지 않고 LPS로만 자극한 대조군이 생성한 PGE₂의 양은 1802.6 ± 19.3 pg/mL이었으나 구아바 추출물을 농도별로 처리한 실험군에서는 농도의존적으로 PGE₂의 생성이 억제되었다. 구아바 추출물을 농도별 (5, 10, 30 µg/mL)로 처리한 실험군의 PGE₂ 생성량은 각각 1475.0 ± 39.5 , 1367.4 ± 36.62 및 1133.1 ± 90.95 pg/mL로 나타났으며 아무런 약물을 처리하지 않고 LPS로만 자극한 대조군에 비해 10 µg/mL 및 30 µg/mL 농도로 처리하였을 때 유의한 억제작용이 나타났다 ($p<0.05$). 인진호의 경우 각각 1564.1 ± 37.7 , 1461.4 ± 58.7 및 1352.1 ± 50.7 pg/mL로 농도별로 감소하는 경향이 나타났으며 인진호 추출물을 5, 10 µg/mL 및 30 µg/mL 농도로 처리하였을 때 PGE₂ 생성량은 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로만 자극한 대조군에 비해 유의적인 감소를 보였다 ($p<0.05$). 황련 추출물을 농도별 (5, 10, 30 µg/mL)로 처리한 실험군의 PGE₂ 생성량은 각각 1492.6 ± 79.9 , 1359.4 ± 10.9 및 1240.6 ± 92.9 pg/mL로 농도 의존적으로 유의한 감소를 보였으며 ($p<0.05$) 포공영 추출물의 경우 PGE₂ 생성량은 각각 1514.3 ± 8.1 , 1388.0 ± 7.4 및 1364.5 ± 10.9 pg/mL로 농도에 따른 유의적인 감소를 나

타내었다 ($p < 0.05$). RAW 264.7 세포에 약용농산물 4종의 추출물을 30 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 각각 처리한 후 LPS로 염증반응을 유도하였을 때 생성되는 PGE_2 의 억제율은 아무런 약물을 처리하지 않고 LPS로만 자극한 대조군에 비해 구아바 추출물은 37.14% 이었으며 인진호, 황련 및 포공영은 각각 24.30%, 31.18% 및 24.30%로 나타나 약용농산물 4종 중 구아바 추출물이 PGE_2 의 생성 억제 작용이 뛰어나음을 알 수 있었다. 이로써 항염증 효과에 뛰어난 부원료로서 구아바와 인진호를 선발하여 항염증 활성 증진을 위한 최적 추출조건을 확립하고자 한다. 황련의 경우 인진호보다 높은 PGE_2 생성 억제율이 나타났으나 Fig. 115에 나타난 바와 같이 세포생존율이 낮으며 유독성분이 버버린 함유되어 식품공전상 식품에 사용할 수 없는 원료의 목록에 등재되어 있다는 점을 감안하여 항염증 활성 증진을 위한 부원료 재료 선발에 배제되었다.

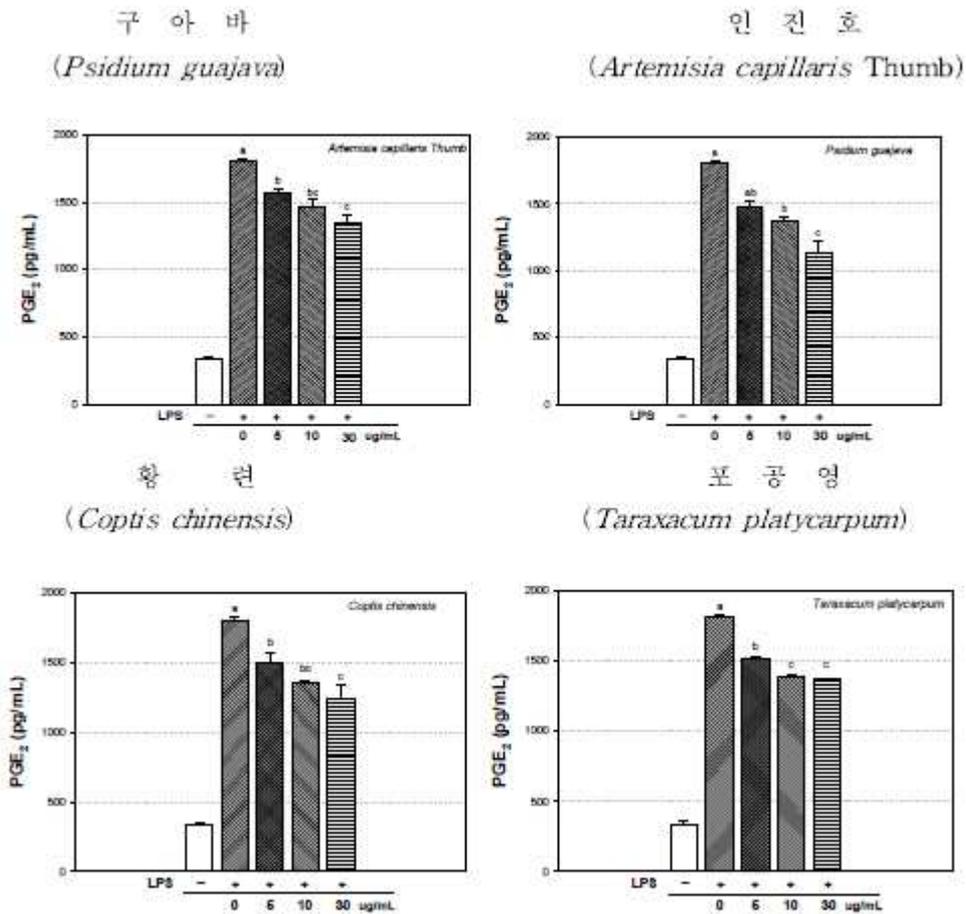


Figure. 117. Effect of ethanolic extracts from *Psidium guajava*, *Artemisia capillaris* Thumb, *Coptis chinensis* and *Taraxacum platycarpum* on PGE_2 production in LPS- induced RAW 264.7 cells for 24hr incubation. Each column represents the mean \pm standard deviation($n=3$). Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

2. 항염증 활성 증진을 위한 구아바 및 사철쭉 (인진호)의 추출조건의 최적화

- 예비실험을 통해 우수한 항염증 활성을 나타내는 구아바와 인진호를 최종 부원료로 선정하였으며 추출조건에 따른 추출특성의 모니터링 및 추출조건의 최적화를 위하여 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM)을 이용하여 구아바 잎 및 인진호

의 추출조건의 최적화를 확립하고자 한다.

가. 재료 및 방법

(1) 추출물의 제조

- 본 연구에 사용한 포공영, 인진호, 황련은 경희한약에서 구입하여 사용하였으며 구아바 잎은 제주대학교에서 제공받아 사용하였다. 2011년 1월 31일에 채취하여 건조된 포공영 (*Taraxacum platycarpum*), 2010년 8월 13일에 채취하여 건조된 인진호 (*Artemisia capillaris* Thumb) 및 2011년 1월 27일에 채취하여 건조된 황련 (*Coptis chinensis*)을 각각 분쇄기를 사용하여 마쇄한 후 20 mesh체를 통과시켜 추출하였고 구아바 잎 (*Psidium guajava*)은 2011년 5월 2일에 채취하여 건조된 것을 분쇄기를 사용하여 마쇄한 후 20 mesh체를 통과시켜 추출하였다.

(2) 추출조건 최적화를 위한 실험계획

- 본 실험에서는 추출조건에 따른 추출특성의 모니터링과 추출조건의 최적화를 위하여 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM)을 이용하였다. 추출조건의 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획법 (Central Composite Design, CCD)에 의하여 설계하였고, 반응표면분석을 위해서는 SAS (statistical analysis system) program을 사용하였다. 중심합성계획에 의한 독립변수 (X_i)의 실험계획은 Table 7과 같이 추출공정에서 중요한 변수로 고려되는 인자, 즉 시료의 추출온도 (X_1), 추출용매의 에탄올 농도 (X_2) 및 추출시간 (X_3)을 -1.68, -1, 0, 1, 1.68의 5단계로 부호화하였다 (Table 23). 독립변수 (X_i)는 중심합성계획에 따라 Table 24과 같이 20구간으로 설정하여 추출실험을 실시하였다 (Table 24). 또한, 이들 요인변수에 의한 영향을 받는 종속변수 (Y_n)는 추출물의 품질인자로서 수율 (Y_1), 총 폴리페놀 함량 (Y_2), NO production (Y_3) 및 PGE₂ production (Y_4)으로 하였으며, 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. 변수들의 추출특성과 그에 상응하는 최적 추출조건은 Mathematica program을 이용하여 4차원 반응표면으로 나타내었다.

Table 23. Independent variables and their levels used in the response surface design.

Independent variables	Symbol	Factor level				
		-1.682	-1	0	1	1.682
Extraction temperature (°C)	X_1	30	42	60	78	90
EtOH (%)	X_2	0	20	50	80	100
Extraction time (hr)	X_3	1	3	6	9	11

(3) 수율

- 각 조건별로 추출한 시료의 총 추출수율은 함량을 구한 수기에 추출액 10 mL을 취하여 105 °C에서 증발 건조시킨 후 그 무게를 측정하였으며, 추출물 조제에 사용된 원료량 (건물량)에 대한 백분율로써 추출 수율 (% , total extract yield)을 나타내었다.

(4) 총 폴리페놀 함량

- 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다. 각 추출물 500 μ L에 1 N Folin-Ciocalteau's phenol reagent 500 μ L 및 2% Na_2CO_3 10 mL을 가하고 혼합한 다음 실온에서 1시간 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로는 gallic acid를 사용하여 구한 검량곡선으로부터 시료 중의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

(5) MTT assay

- 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하였다. RAW 264.7 cells을 1×10^5 cells/well로 96 well plate에 분주한 후 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 추출물을 농도별(5, 10, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 전 처리한 후 24시간동안 반응시켰다.

(6) NO 생성량 측정

- NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cells를 1×10^5 cells/well로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 추출물 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 전처리하고 2시간 후 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 μL 를 96 well plate에 취하고, 여기에 동량의 Griess reagent를 넣어 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

Table 24. Central composite design for the optimization of extraction condition for *Artemisia capillaris* Thumb and *Psidium guajava*.

No.	Coded Levels of Variables			Response		
	X ₁	X ₂	X ₃	Extraction temperature (°C)	EtOH (%)	Extraction time (hr)
1	-1	-1	-1	42	20	3
2	1	-1	-1	78	20	3
3	-1	1	-1	42	80	3
4	1	1	-1	78	80	3
5	-1	-1	1	42	20	9
6	1	-1	1	78	20	9
7	-1	1	1	42	80	9
8	1	1	1	78	80	9
9	-1.682	0	1	30	50	6
10	1.682	0	1	90	50	6
11	0	-1.682	1	60	0	6
12	0	1.682	1	60	100	6
13	0	0	-1.682	60	50	1
14	0	0	1.682	60	50	11
15	0	0	0	60	50	6
16	0	0	0	60	50	6
17	0	0	0	60	50	6
18	0	0	0	60	50	6
19	0	0	0	60	50	6
20	0	0	0	60	50	6

(7) PGE₂ 생성량 측정

- RAW 264.7 cells를 6 well plate에 1×10⁶ cells/mL의 세포수가 되도록 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 RPMI 1640배지로 교환 후 추출물 30 µg/mL 농도로 세포에 전처리하고 2시간동안 배양한 후 LPS(1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 5,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 PGE₂ enzyme immune assay (EIA) kit (R&D Systems, Abington, UK)을 사용하여 PGE₂ 양을 측정하였다.

나. 구아바 연구수행 결과

(1) 추출조건에 따른 추출물의 이화학적 특성

- 구아바 및 인진호를 이용하여 항염증 활성이 높이고 제품화를 위한 최적추출을 확립하고자 중심합성계획에 의한 20구간의 추출조건에 따라 추출시험을 실시하고, 이때 얻어진 각각의 추출물에 대하여 수율, 총페놀성 화합물 함량, NO 생성량 및 PGE₂ 생성량을 측정된 결과는 Table 24에 나타내었다. 각각의 결과를 이용하여 최적 추출조건을 얻고자 반응표면 회귀분석을 실시하여 각 종속변수 즉, 수율, 총페놀성 화합물 함량, NO 생성량 및 PGE₂ 생성량에 대한 회귀식을 얻었다 (Table 25). 또한 변수별 최적 추출조건과 품질특성 값을 예측하여 Table 25에 나타내었으며, 각각의 종속변수들의 4차원 반응표면은 Mathematica program으로 추출온도(X₁), 추출용매의 에탄올 농도 (X₂)

및 추출시간 (X_3)를 독립변수로 하여 Fig. 118~119에 나타내었다.

Table 25. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of *Psidium guajava*.

Response	Second order Polynomials	R ²	Significance
Yield	$Y_Y = 83.272705 - 2.004304X_1 - 0.281121X_2 - 0.522449X_3 + 0.017386X_1^2 + 0.007755X_1X_2 - 0.007081X_2^2 + 0.003472X_1X_3 + 0.004028X_2X_3 + 0.021894X_3^2$	0.9086	0.0004
Total phenolic compound	$Y_{TP} = 93.542465 - 0.690086X_1 - 0.082600X_2 - 2.165496X_3 + 0.006409X_1^2 + 0.000704X_1X_2 + 0.000979X_2^2 - 0.010556X_1X_3 - 0.005139X_2X_3 + 0.274716X_3^2$	0.8964	0.0007
LPS induced NO production	$Y_{NO} = 51.658160 - 0.099846X_1 - 0.283024X_2 + 0.992187X_3 + 0.006716X_1^2 - 0.005222X_1X_2 + 0.004944X_2^2 - 0.036713X_1X_3 - 0.003361X_2X_3 + 0.200393X_3^2$	0.9062	0.0005
LPS induced PGE ₂ production	$Y_P = 79.995882 - 0.663475X_1 - 0.458842X_2 - 1.232247X_3 + 0.009340X_1^2 - 0.002569X_1X_2 + 0.005980X_2^2 - 0.015046X_1X_3 - 0.015417X_2X_3 + 0.294641X_3^2$	0.9244	0.0002

X_1 : Extraction temperature (°C), X_2 : EtOH (%), X_3 : Extraction time (hr).

(2) 추출조건이 수율에 미치는 영향

- 구아바의 추출조건에 따른 수율을 측정 한 결과는 Table 24와 같이 26.81~83.14%의 범위로 측정되었으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R²값은 0.9086으로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다 (Table 23). 예측된 정상점은 안장점 (saddle point)으로 시료에 대한 추출온도는 89.53 °C, 추출용매의 에탄올 농도는 58.72%, 추출시간은 6.15 hr에서 최대값 77.02%로 예측되었다 (Table 25). 이것은 반응표면분석으로 예측된 값을 나타낸 것으로 수율은 추출물의 에탄올 농도와 추출온도가 높을수록 높아지는 것으로 나타났으며, 추출온도와 추출용매에 대한 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 118A).

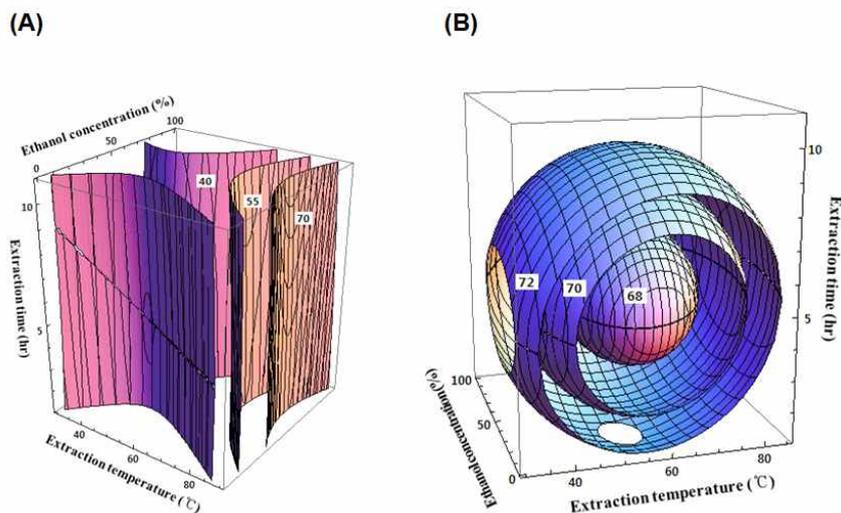


Figure. 117. Response surface for yield in *Psidium guajava* extract at constant value (yield:

40-55-70%) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time (A). Response surface for total phenolics in *Psidium guajava* extract at constant value (total phenolics: 68-70-72 mg/100g) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time (B).

(3) 추출조건이 Total phenolics에 미치는 영향

- 추출조건에 따른 추출물의 총페놀성 화합물 함량을 측정한 결과에 대한 회귀식의 R^2 값은 0.8964이었으며 총페놀성 화합물 함량의 예측된 정상점은 최소점 (minimum point)으로 시료에 대한 추출온도가 59.52 °C, 추출용매의 에탄올 농도는 50.17%, 추출시간은 11.0 hr일 때 최대값 75.26 mg/100g으로 예측되었다 (Table 25). 이것은 반응표면분석으로 예측된 값을 나타낸 것으로 총페놀성 화합물 함량은 추출물의 에탄올 농도와 추출시간이 증가할수록 높아지는 것으로 나타났으며, 총페놀성 화합물 함량은 추출시간과 추출용매에 대한 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 118B).

(4) 추출조건이 NO 생성에 미치는 영향

- 중심합성계획에 의한 구아바 추출조건별 NO의 생성량은 48.90~70.29%의 범위로 나타났으며 (Table 25), 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R^2 는 0.9062로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다 (Table 24). 세균성 염증유발물질인 지질다당류 (LPS, lipopolysaccharide)에 의한 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들 (pro-inflammatory mediators)가 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등이 있다. 구아바 추출물의 경우 LPS로 자극한 세포배양액의 NO 생성량을 측정한 결과 예측된 정상점은 최소점 (minimum point)으로 추출온도가 38.66 °C, 추출용매의 에탄올 농도는 49.90%, 추출시간은 2.50 hr일 때 NO 생성량이 가장 낮은 값인 45.71%로 나타났다 (Table 26). NO의 생성량은 추출용매의 농도가 높을수록 추출온도와 추출시간은 낮을수록 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타났다.

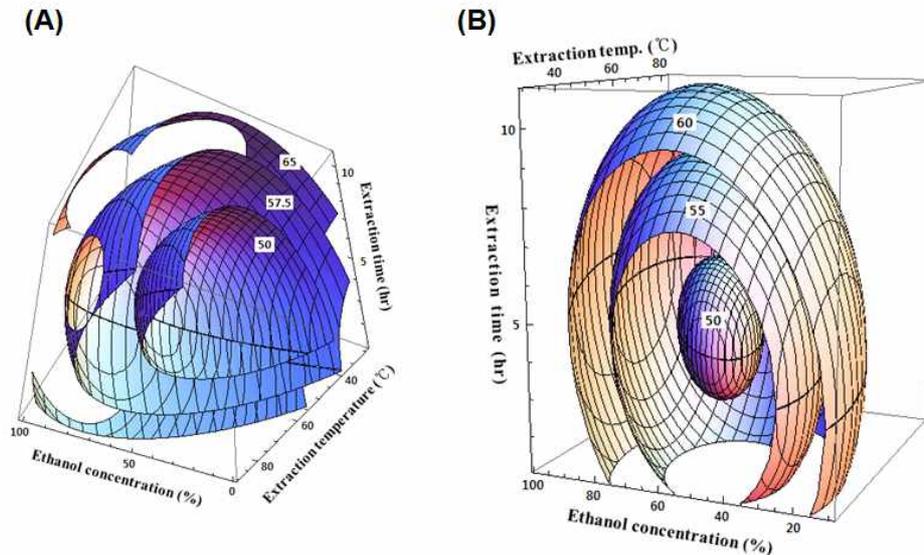


Figure. 118. Response surface for NO production in *Psidium guajava* extract at constant value (NO production: 50–57.5–65%) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time (A). Response surface for PGE₂ production in *Psidium guajava* extract at constant value (PGE₂ production: 50–55–60%) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time (B).

(5) 추출조건이 PGE₂ 생성에 미치는 영향

- 추출조건에 따른 PGE₂의 생성량은 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로만 자극한 대조군에 비해 Table 24와 같이 48.95~73.38%의 범위로 나타났으며, 결과에 대한 반응 표면 회귀식의 R²는 0.9244로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다 (Table 26). 염증반응에는 cytokines, prostaglandin E2 (PGE2), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있는 데 특히, 대식세포에서 cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화시키며 그 결과 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시켜 과량의 PGE₂를 생성하여 염증을 일으킨다. 구아바 추출물을 처리한 후 LPS로 자극한 세포의 배양액에서 생성된 PGE₂ 양을 측정한 결과 예측된 정상 점은 최소점 (minimum point)으로 추출온도가 47.24 °C, 추출용매의 에탄올 농도는 54.58%, 추출시간은 4.77 hr일 때 PGE₂ 생성량이 가장 낮은 값인 49.07%로 나타났다 (Table 27). PGE₂의 생성량은 추출용매의 농도는 높고 추출온도와 추출시간은 낮을수록 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 NO 생성량과 유사한 경향이였다.

Table 26. Experimental data on yield, total phenolics, NO production and PGE₂ production in *Psidium guajava* extract under different conditions based on central composite design for response surface analysis.

No.	Yield (%)	Total phenolics (mg/100g)	LPS induced NO production (%)	LPS induced PGE ₂ production (%)
1	37.43	69.45	48.90	55.14
2	41.63	71.39	67.69	68.32
3	36.82	72.29	49.65	56.47
4	56.72	74.88	51.25	59.23
5	38.57	73.04	65.34	68.32
6	42.51	71.84	70.29	73.38
7	38.43	73.16	58.97	59.32
8	60.05	74.34	58.55	63.61
9	41.11	70.70	49.74	48.95
10	83.14	75.44	67.69	68.65
11	30.70	69.18	69.79	70.47
12	26.81	70.32	59.51	60.22
13	47.33	72.54	56.11	57.69
14	46.70	75.80	59.39	57.83
15	44.99	65.18	50.41	49.19
16	45.11	67.88	50.07	50.98
17	45.59	65.18	50.24	51.34
18	45.16	68.33	50.32	51.71
19	45.36	67.65	50.16	52.58
20	45.32	69.36	52.57	52.30

Table 27. Predicted levels of optimum conditions for the maximized and minimized responses of variables by the ridge analysis of their response surface.

Responses	X ₁	X ₂	X ₃	Estimated responses	Morphology
Yield (%)	58.66	0.05	6.04	24.44(min)	saddle point
	89.53	58.72	6.15	77.02(max)	
Total phenolics (mg/100g)	56.41	37.61	5.40	66.79(min)	minimum
	59.52	50.17	11.00	75.26(max)	
LPS induced NO production (%)	38.66	49.90	2.50	45.71(min)	minimum
	75.51	7.57	6.56	74.35(max)	
LPS induced PGE ₂ production (%)	47.24	54.58	4.77	49.07(min)	minimum
	73.44	6.73	7.12	75.12(max)	

X₁: Extraction temperature (°C), X₂: EtOH (%), X₃: Extraction time (hr).

(6) 최적 추출조건 예측

- 구아바 최적 추출조건을 설정하기 위하여 NO 와 PGE₂ production을 모두 만족시켜주는 최적 추출조건을 얻고자 각 반응표면을 superimposing하여 Fig. 129에 나타내었다.

이 반응표면으로부터 설정될 수 있는 최적조건 범위는 Fig. 119에 중첩되는 부분으로써 Table 28에 최적조건을 나타내었다. 구아바 추출 최적 범위는 추출온도 38~56 °C, 에탄올 농도 42~68% 및 추출시간 3~6 시간으로 나타났다.

Table 28. The range of optimum extraction condition for maximum response variables by superimposing response surface of NO and PGE₂ production in *Psidium guajava* extract.

Extraction Condition	Range of predicted condition (optional point)
Extraction temperature (°C)	38~56 (47)
EtOH (%)	42~68 (55)
Extraction time (hr)	3~6 (4.5)

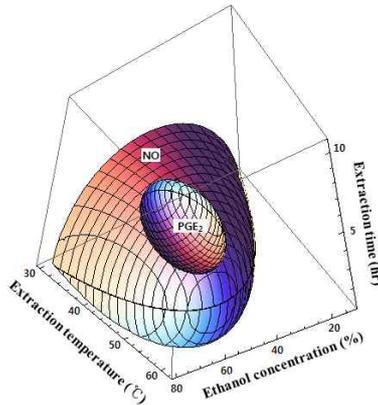


Figure 119. Superimposed response surface for optimization of NO and PGE₂ production of *Psidium guajava* extract as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time.

다. 인진호 연구수행 결과

(1) 추출조건이 수율에 미치는 영향

- 인진호의 추출조건에 따른 수율을 측정된 결과는 Table 14와 같이 13.75~39.24%의 범위로 측정되었으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R²값은 0.9089로 유의성이 5% 이내의 유의수준에서 인정되었다 (Table 29). 예측된 정상점은 안장점 (saddle point)으로 시료에 대한 추출온도는 89.66 °C, 추출용매의 에탄올 농도는 50.85%, 추출시간은 6.74 hr에서 최대값 39.24%로 예측되었다 (Table 30). 이것은 반응표면분석으로 예측된 값을 나타낸 것으로 수율은 추출물의 에탄올 농도는 낮을수록 추출온도는 높을수록 높아지는 것으로 나타났으며 추출온도에 가장 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 120A).

Table 29. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of *Artemisia capillaris* Thumb.

Response	Second order Polynomials	R ²	Significance
Yield	$Y_Y = 43.300079 - 1.067861X_1 + 0.151573X_2 - 1.009167X_3 + 0.0$	0.9089	0.0004
	$10386X_1^2 + 0.000741X_1X_2 - 0.002181X_2^2 + 0.010185X_1X_3 + 0.0019$ $44X_2X_3 + 0.059906X_3^2$		
Total phenolic compound	$Y_{TP} = 54.381526 - 0.143614X_1 + 0.416293X_2 + 0.191777X_3 + 0.0$	0.9303	0.0001
	$03459X_1^2 - 0.002315X_1X_2 - 0.002197X_2^2 - 0.004491X_1X_3 + 0.0004$ $17X_2X_3 + 0.037325X_3^2$		
LPS induced NO production	$Y_{NO} = 166.746113 - 1.795566X_1 - 0.476033X_2 - 12.006566X_3 + 0.0$	0.9062	0.0005
	$13512X_1^2 - 0.007505X_1X_2 + 0.009401X_2^2 - 0.075766X_1X_3 - 0.0086$ $32X_2X_3 + 0.595208X_3^2$		
LPS induced PGE ₂ production	$Y_P = 173.194583 - 2.523157X_1 - 0.289006X_2 - 11.023825X_3 + 0.01$	0.9123	0.0003
	$9932X_1^2 - 0.007467X_1X_2 + 0.008825X_2^2 - 0.072940X_1X_3 - 0.02913$ $1X_2X_3 + 0.660889X_3^2$		

X₁: Extraction temperature (°C) / X₂: EtOH (%) / X₃: Extraction time (hr)

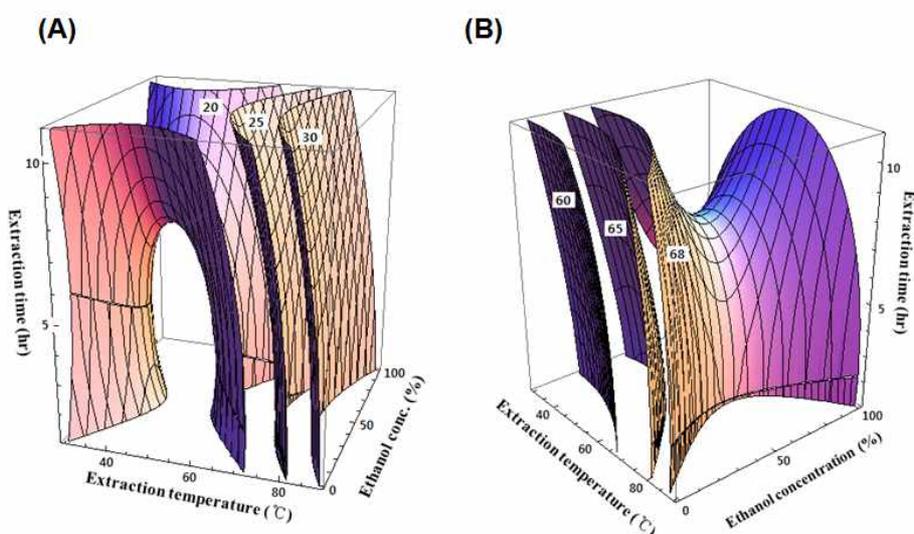


Figure 120. Response surface for yield in *Artemisia capillaris* Thumb extract at constant value (yield: 20–25–30%) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time (A). Response surface for total phenolics in *Artemisia capillaris* Thumb extract at constant value (total phenolics: 60–65–68 mg/100g) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time (B).

(2) 추출조건이 Total phenolics에 미치는 영향

- 추출조건에 따른 추출물의 총페놀성 화합물 함량을 측정한 결과에 대한 회귀식의 R²값은 0.9309로 유의성 5%이내의 유의수준에서 인정되었다 (Table 27). 총페놀성 화합물 함량의 예측된 정상점은 안장점 (saddle point)으로 시료에 대한 추출온도가 89.62 °C, 추출용매의 에탄올 농도는 49.05%, 추출시간은 6.78 hr일 때 최대값 74.68 mg/100g으로 예측되었다 (Table 28). 이것은 반응표면분석으로 예측된 값을 나타낸 것으로 총페

놀성 화합물 함량은 추출물의 에탄올 농도와 추출시간이 증가할수록 높아지는 것으로 나타났으며, 총페놀성 화합물 함량은 추출시간과 추출용매에 대한 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 120B).

(3) 추출조건이 NO 생성에 미치는 영향

- 중심합성계획에 의한 인진호 추출조건별 NO의 생성량은 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로만 자극한 대조군의 NO 생성량에 비해 Table 14와 같이 58.55~87.02%의 범위로 나타났으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R^2 는 0.9062로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 27). 세균성 염증유발물질인 지질다당류 (LPS, lipopolysaccharide)에 의한 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들 (pro-inflammatory mediators)가 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등이 있다. 인진호 추출물을 처리한 후 LPS로 자극한 세포의 배양액에서 생성된 NO 양을 측정한 결과 예측된 정상점은 최소점 (minimum point)으로 추출온도가 64.55 °C, 추출용매의 에탄올 농도는 54.60%, 추출시간은 6.46 hr일 때 NO 생성량이 가장 낮은 값인 58.55%로 나타났다 (Table 28). NO의 생성량 추출용매의 농도는 낮고 추출온도와 추출시간은 높을수록 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타났다.

(4) 추출조건이 PGE₂ 생성에 미치는 영향

- 인진호의 추출조건에 따른 PGE₂의 생성량은 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로만 자극한 대조군의 PGE₂ 생성량에 비해 Table 28와 같이 53.94~83.63%의 범위로 나타났으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R^2 는 0.9123로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다 (Table 27). 염증반응에는 cytokines, prostagrandin E₂ (PGE₂), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있는데 특히, 대식세포에서 cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화시키며 그 결과 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시켜 과량의 PGE₂를 생성하여 염증을 일으킨다. 인진호 추출물을 처리한 후 LPS로 자극한 세포의 배양액에서 생성된 PGE₂ 양을 측정한 결과 예측된 정상점은 최소점 (minimum point)으로 추출온도가 60.00 °C, 추출용매의 에탄올 농도는 50.00%, 추출시간은 6.00 hr일 때 PGE₂ 생성량이 가장 낮은 값인 53.94%로 나타났다 (Table 28). PGE₂의 생성량은 추출용매의 농도는 낮고 추출온도와 추출시간은 높을수록 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 NO 생성량과 유사한 경향이였다.

Table 30. Predicted levels of optimum conditions for the maximized and minimized responses of variables by the ridge analysis of their response surface.

Responses	X ₁	X ₂	X ₃	Estimated responses	Morphology
Yield (%)	51.04	97.20	5.30	13.75(min)	saddle point
	89.66	50.85	6.74	39.24(max)	
Total phenolics (mg/100g)	50.03	3.23	5.40	57.72(min)	saddle point
	89.62	49.05	6.78	74.68(max)	
LPS induced NO production (%)	64.55	54.60	6.46	58.55(min)	minimum
	43.92	85.29	3.68	87.02(max)	
LPS induced PGE ₂ production (%)	60.00	50.00	6.00	53.94(min)	minimum
	41.31	80.99	3.62	83.63(max)	

X₁: Extraction temperature (°C), X₂: EtOH (%), X₃: Extraction time (hr).

(5) 최적 추출조건 예측

- 쑥 최적 추출조건을 설정하기 위하여 NO 와 을 모두 만족시켜주는 최적 추출조건을 얻고자 각 반응표면을 superimposing하여 Fig. 131에 나타내었다. 이 반응표면으로부터 설정될 수 있는 최적조건 범위는 Fig. 121에 중첩되는 부분으로써 NO production이 PGE₂ production에 모두 수용되는 형상으로 나타났으며, Table 31에 최적조건을 나타내었다. 쑥 추출 최적 범위는 추출온도 53~73 °C, 에탄올 농도 42~66% 및 추출시간 5~8시간으로 나타났다.

Table 31. The range of optimum extraction condition for maximum response variables by superimposing response surface of NO and PGE₂ production in *Psidium guajava* extract.

Extraction Condition	Range of predicted condition (optional point)
Extraction temperature (°C)	53~73 (63)
EtOH (%)	42~66 (54)
Extraction time (hr)	4.5~7.5 (6.0)

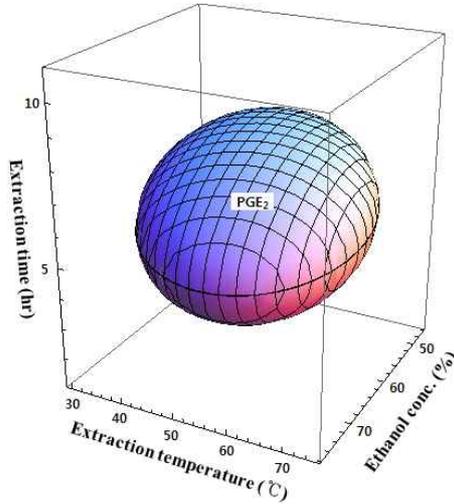


Figure. 121. Superimposed response surface for optimization of NO and PGE₂ production of *Artemisia capillaris* Thumb extract as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction.

3. 항염증 활성 증진을 위한 재래감굴 팔삭 과피의 추출조건 최적화

가. 재료 및 방법

- 본 실험에서는 추출조건에 따른 추출특성의 모니터링과 추출조건의 최적화를 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였다. 추출조건의 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획법(Central Composite Design, CCD)에 의하여 설계하였고, 반응표면분석을 위해서는 SAS (statistical analysis system) program을 사용하였다. 중심합성계획에 의한 독립변수(X_i)의 실험계획은 Table 32와 같이 추출공정에서 중요한 변수로 고려되는 인자, 즉 추출용매의 에탄올 농도(X_1), 추출온도(X_2) 및 추출시간(X_3)을 -1.68, -1, 0, 1, 1.68의 5단계로 부호화하였다(Table 32). 독립변수(X_i)는 중심합성계획에 및 Table 12와 같이 20구간으로 설정하여 추출실험을 실시하였다(Table 33). 또한, 이들 요인변수에 의한 영향을 받는 종속변수(Y_n)는 추출물의 품질인자로서 수율(Y_1), 총 폴리페놀 함량(Y_2), NO 생성량(Y_3) 및 PGE₂ 생성량(Y_4)으로 하였으며, 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. 변수들의 추출특성과 그에 상응하는 최적 추출조건은 Mathematica program을 이용하여 4차원 반응표면으로 나타내었다.

(1) 수율

- 각 조건별로 추출한 시료의 총 추출수율은 항량을 구한 수기에 추출액 10 mL을 취하여 105°C에서 증발 건조시킨 후 그 무게를 측정하였으며, 추출물 조제에 사용된 원료량(건물량)에 대한 백분율로써 추출 수율(% , total extract yield)을 나타내었다.

(2) 총 폴리페놀 함량

- 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다. 각 추출물 20 μ L에 1N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 45 μ L 및 2% Na₂CO₃ 135 μ L을 가하고 혼합한 다음 실온에서 2시간 정치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표

준물질로는 gallic acid를 사용하여 구한 검량곡선으로부터 시료 중의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

(3) MTT assay

- 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하였다. RAW 264.7 cells을 1×10^5 cells/well로 96 well plate에 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 추출물을 농도별(30, 50, 100, 200 µg/ml)로 전 처리한 후 24시간동안 반응시켰다.

(4) NO 생성량 측정

- NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cells를 1×10^5 cells/well로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 각 추출물을 100 µg/ml 농도로 전처리하고 2시간 후 LPS(1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 µL를 96 well plate에 취하고, 여기에 동량의 Griess reagent를 넣어 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

(5) PGE₂ 생성량 측정

- RAW 264.7 cells를 6 well plate에 1×10^6 cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 RPMI 1640배지로 교환 후 각 추출물을 100 µg/ml 농도로 세포에 전처리하고 2시간동안 배양한 후 LPS(1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 5,000 rpm에서 3분동안 원심분리하여 분리된 상층액을 PGE₂ enzyme immune assay (EIA) kit (R&D Systems, Abington, UK)을 사용하여 PGE₂ 양을 측정하였다.

Table 32. Independent variables and their levels used in the response surface design.

Independent variables	Symbol	Factor level				
		-1.682	-1	0	1	1.682
EtOH (%)	X ₁	15	31	55	79	95
Extraction temperature (°C)	X ₂	30	41	58	75	86
Extraction time (hr)	X ₃	1	3	5	7	9

X₁: EtOH (%), X₂: Extraction temperature (°C), X₃: Extraction time (hr).

Table 33. Central composite design for the optimization of extraction condition for *Citrus hassaku* pericarp.

No.	Coded Levels of Variables			Response		
	X ₁	X ₂	X ₃	EtOH (%)	Extraction temperature (°C)	Extraction time (hr)
1	-1	-1	-1	31	41	3
2	1	-1	-1	79	41	3
3	-1	1	-1	31	75	3
4	1	1	-1	79	75	3
5	-1	-1	1	31	41	7
6	1	-1	1	79	41	7
7	-1	1	1	31	75	7
8	1	1	1	79	75	7
9	-1.6818	0	0	15	58	5
10	1.6818	0	0	95	58	5
11	0	-1.6818	0	55	30	5
12	0	1.6818	0	55	86	5
13	0	0	-1.6818	55	58	1
14	0	0	1.6818	55	58	9
15	0	0	0	55	58	5
16	0	0	0	55	58	5
17	0	0	0	55	58	5
18	0	0	0	55	58	5
19	0	0	0	55	58	5
20	0	0	0	55	58	5

X₁: EtOH (%), X₂: Extraction temperature (°C), X₃: Extraction time (hr).

나. 팔삭과피 연구수행 결과

- 팔삭과피의 최적추출조건을 확립하고자 중심합성계획에 따라 추출조건 20구간에 대한 추출시험을 실시하고, 이때 얻어진 각각의 추출물에 대하여 수율, 총 페놀성 화합물 함량, NO 생성량 및 PGE₂ 생성량을 측정하였다(Table 34). 각각의 결과를 이용하여 최적 추출조건을 얻고자 반응표면 회귀분석을 실시하여 각 종속변수 즉, 수율, 총페놀성 화합물 함량, NO 생성량 및 PGE₂ 생성량에 대한 회귀식을 얻었다(Table 33). 또한 변

수별 최적 추출조건과 품질특성 값을 예측하여 Table 36에 나타내었으며, 각각의 종속 변수들의 4차원 반응표면은 Mathematica program으로 에탄올 농도추출온도(X_1), 추출 온도(X_2) 및 추출시간(X_3)을 독립변수로 하여 Fig 125~128에 나타내었다.

(1) 수율

- 중심합성계획에 따른 20구간에 대한 팔삭 과피의 추출물들의 수율은 Fig. 122에 나타낸 바와 같다. 식물추출물의 생리활성효과가 우수하여도 그 추출수율이 낮으면 경제성이 없어 실질적으로 이용하기 어려운 측면이 있기 때문에 추출수율은 식물추출물의 제형화 및 산업화를 위해 고려되어야 할 중요한 요인 중 하나이다. 본 시험 결과, 에탄올 농도가 55%, 추출온도가 75 °C, 추출시간이 5시간인 12번 구간 추출물의 수율이 $51.69 \pm 0.07\%$ 로 가장 높았으며 에탄올 농도가 95%, 추출온도가 53 °C, 추출시간이 5시간인 10번 구간의 추출물은 $38.95 \pm 0.33\%$ 로 가장 낮았다.

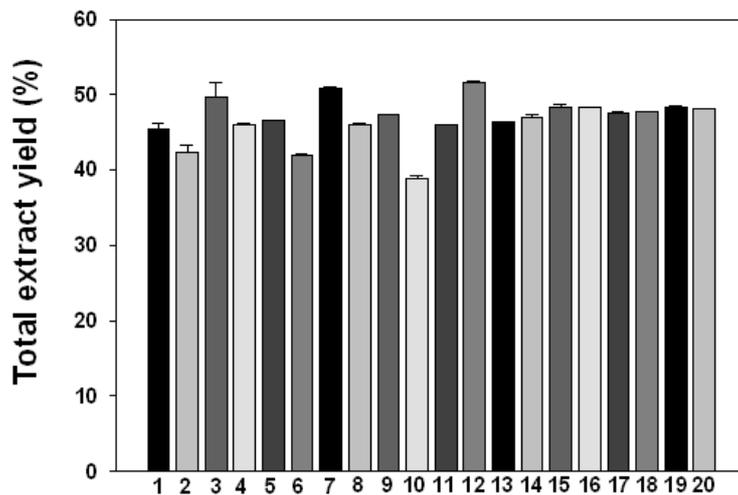


Figure 122. Total extract yield of ethanolic extracts from *Citrus hassaku* pericarp. Data are presented as mean±standard deviation(n=3).

(2) 총페놀성 화합물

- 페놀성 물질은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가진다. 식물체에 존재하는 다양한 페놀 화합물은 수산기를 통한 수소 공여와 페놀 고리 구조의 공명 안정화에 의해 항산화 능력을 나타낸다. 본 시험 결과, 에탄올 농도가 55%, 추출온도가 53 °C, 추출시간이 9시간인 14번 구간 추출물의 총 페놀성 함량이 47.16 ± 0.89 mg/g 으로 가장 높았으며 에탄올 농도가 15%, 추출온도가 53 °C, 추출시간이 5시간인 9번 구간의 추출물은 35.38 ± 0.31 mg/g 으로 가장 낮았다(Fig. 123).

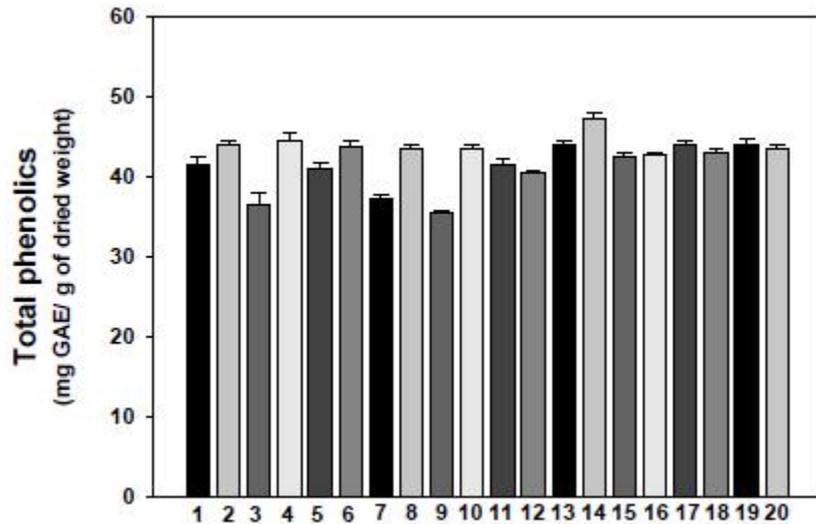


Figure. 123. Total phenolic content of ethanolic extracts from *Citrus hassaku* pericarp. The level of total phenolics is expressed as mg gallic acid equivalents/g dry weight. Data are presented as mean±standard deviation(n=3).

(3) 농도별 세포생존율의 변화

- 중심합성계획에 따른 20구간에 대한 팔삭 과피의 추출물들이 마우스 대식세포인 RAW 264.7의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 각 추출물들을 농도별 (30, 50, 100, 200 µg/mL)로 24시간 동안 처리한 결과는 Fig. 124와 같았다.

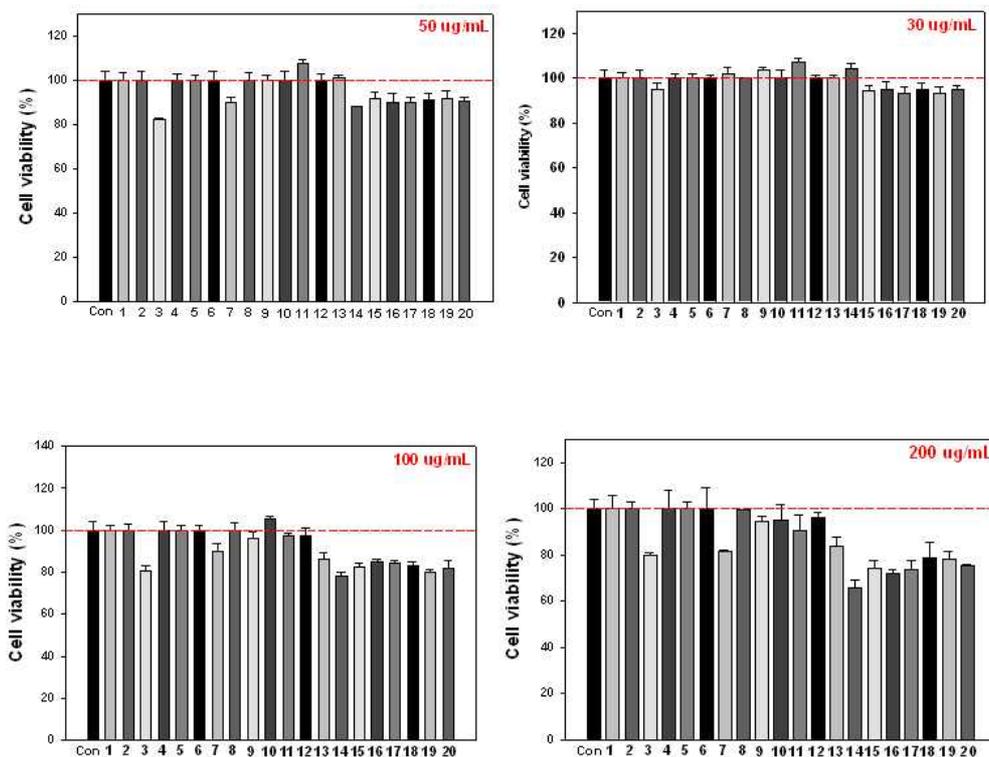


Figure. 124. Effect of ethanolic extracts from *Citrus hassaku* pericarp on cell viability in RAW 264.7. Each column represents the mean±standard deviation(n=3).

(4) 추출조건이 수율에 미치는 영향

- 팔삭 과피의 추출조건에 따른 수율을 측정한 결과는 Table 14와 같이 38.95~51.69%의 범위로 측정되었으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R²값은 0.9903으로 유의성이 1% 이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 34). 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 시료에 대한 추출온도는 74.0°C, 추출용매의 에탄올 농도는 43.9%, 추출시간은 5.4 hr에서 최대값 52.49%로 예측되었다(Table 36). 이것은 반응표면분석으로 예측된 값을 나타낸 것으로 수율은 추출물의 에탄올 농도와 추출온도가 높을수록 높아지는 것으로 나타났으며, 추출온도와 추출용매에 대한 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Fig. 125).

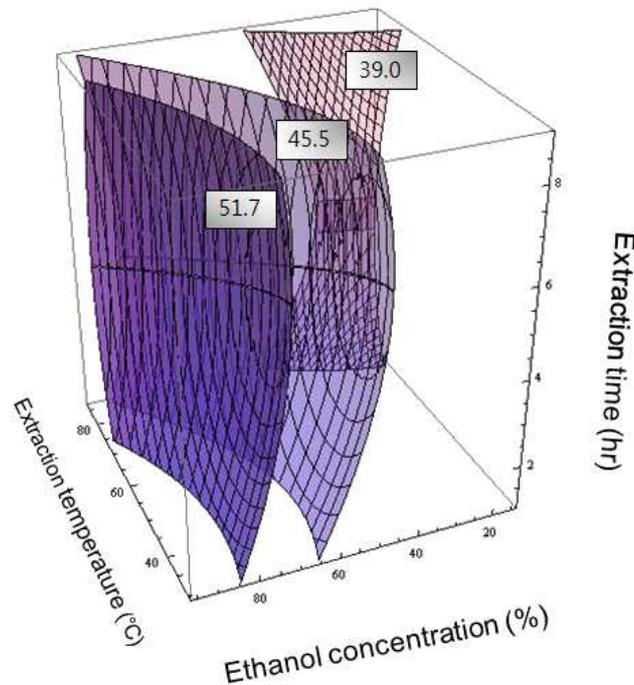


Figure. 125. Response surface for total extract yield in *Citrus hassaku* pericarp at constant value (yield: 39.0-45.5-51.7%) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time.

(5) 추출조건이 Total phenolics에 미치는 영향

- 추출조건에 따른 추출물의 총페놀성 화합물 함량을 측정한 결과에 대한 회귀식의 R²값은 0.9503이었으며 총페놀성 화합물 함량의 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 시료에 대한 추출용매의 에탄올 농도는 65.75%, 추출온도가 52.27°C, 추출시간은 8.85 hr일 때 최대값 46.60 mg/g으로 예측되었다(Table 36) 이것은 반응표면분석으로 예측된 값을 나타낸 것으로 총페놀성 화합물 함량은 추출물의 에탄올 농도와 추출시간이 증가할수록 높아지는 것으로 나타났으며, 총페놀성 화합물 함량은 추출시간과 추출

용매에 대한 에탄올 농도에 가장 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Fig. 126).

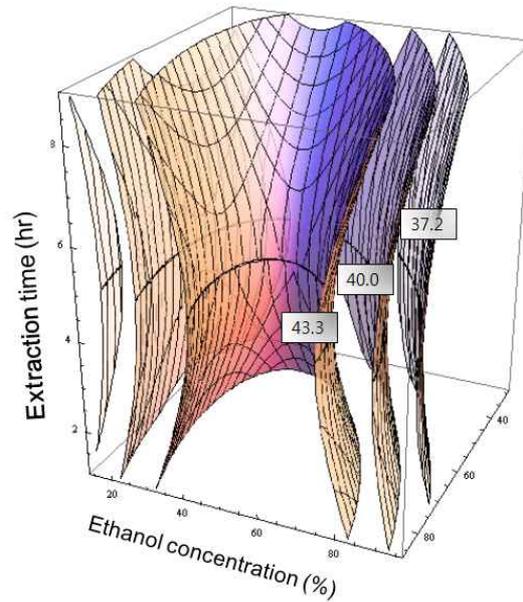


Figure. 126. Response surface for total phenolics in *Citrus hassaku* pericarp extract at constant value (total phenolics: 37.2-40.0-43.3 mg/g) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time.

(6) 추출조건이 NO 생성에 미치는 영향

- 중심합성계획에 의한 팔삭 과피의 추출조건별 NO의 생성량은 63.5~81.7%의 범위로 나타났다으며(Table 35), 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R^2 는 0.9488로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 34). 세균성 염증유발물질인 지질다당류(LPS, lipopolysaccharide)에 의한 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(pro-inflammatory mediators)이 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 만들어지는 nitric oxide(NO)와 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등이 있다. 팔삭 과피 추출물의 경우 LPS로 자극한 세포배양액의 NO 생성량을 측정한 결과 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 추출용매의 에탄올 농도는 42.67%, 추출온도가 33.47°C, 추출시간은 3.26 hr 일 때 NO 생성량이 가장 낮은 값인 59.57%로 나타났다(Table 34) NO의 생성량은 추출용매의 농도가 낮을수록 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타났다.

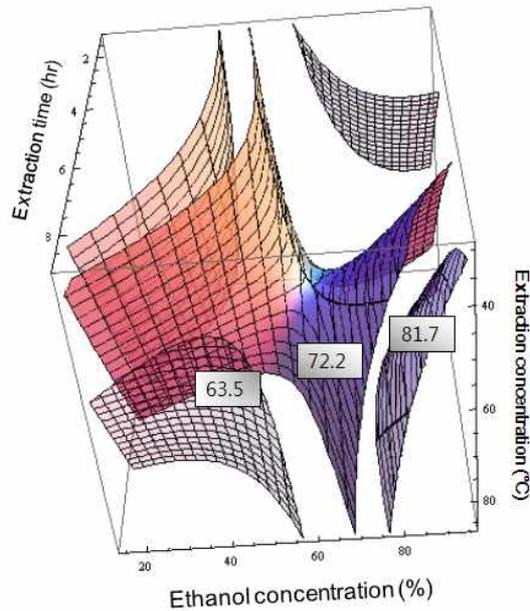


Figure. 127. Response surface for NO production in *Citrus hassaku* pericarp extract at constant value (NO production: 63.5-72.2-81.7%) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time.

(7) 추출조건이 PGE₂ 생성에 미치는 영향

- 추출조건에 따른 PGE₂의 생성량은 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로만 자극한 대조군에 비해 Table 35와 같이 61.9~81.1%의 범위로 나타났으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R²는 0.9594로 유의성이 5%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 34). 염증 반응에는 cytokines, prostagrandin E2 (PGE2), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있는 데 특히, 대식세포에서 cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극에 의해 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화시키며 그 결과 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시켜 과량의 PGE₂를 생성하여 염증을 일으킨다. 팔삭 과피 추출물을 처리한 후 LPS로 자극한 세포의 배양액에서 생성된 PGE₂ 양을 측정한 결과 예측된 정상점은 안장점(saddle point)으로 추출용매의 에탄올 농도는 37.10%, 추출온도가 34.00°C, 추출시간은 3.60 hr일 때 PGE₂ 생성량이 가장 낮은 값인 59.30%로 나타났다(Table 36).

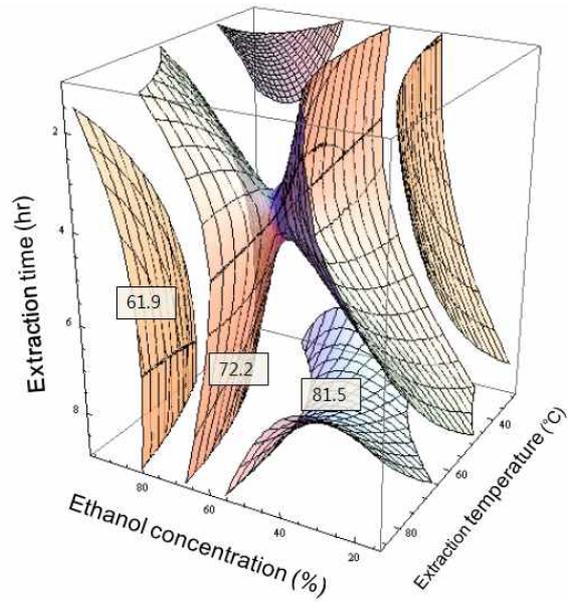


Figure. 128. Response surface for PGE₂ production in *Citrus hassaku* pericarp extract at constant value (PGE₂ production: 61.9-72.2-81.5%) as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time.

Table 34. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of *Citrus hassaku* pericarp.

Response	Second order Polynomials	R ²	Significance
Total extract yield	$Y_Y = 35.357852 - 0.301439X_1 - 0.004153X_2 + 1.259806X_3 - 0.003131X_1^2 - 0.000322X_1X_2 + 0.001484X_2^2 - 0.006719X_1X_3 + 0.001157X_2X_3 - 0.086066X_3^2$	0.9903	< 0.0001
Total phenolic content	$Y_{TP} = 32.312353 + 0.204201X_1 + 0.245401X_2 - 1.138844X_3 - 0.002459X_1^2 + 0.003533X_1X_2 - 0.004835X_2^2 - 0.003698X_1X_3 + 0.002884X_2X_3 + 0.135698X_3^2$	0.9503	0.0907
LPS induced NO production	$Y_{NO} = -7.662093 + 0.391837X_1 + 2.020014X_2 + 3.515877X_3 + 0.000611X_1^2 - 0.010219X_1X_2 - 0.007047X_2^2 + 0.015833X_1X_3 - 0.111494X_2X_3 + 0.262211X_3^2$	0.9488	0.0001
LPS induced PGE ₂ production	$Y_P = -11.515066 + 0.605215X_1 + 2.036909X_2 + 2.461893X_3 + 0.001041X_1^2 - 0.012041X_1X_2 - 0.008426X_2^2 - 0.011198X_1X_3 - 0.071424X_2X_3 + 0.307473X_3^2$	0.9594	0.0001

X₁: EtOH (%), X₂: Extraction temperature (°C), X₃: Extraction time (hr).

Table 35. Experimental data on total extract yield, total phenolics, NO production and PGE₂ production in *Citrus hassaku* pericarp extract under different conditions based on central composite design for response surface analysis.

No.	Total extract yield (%)	Total phenolics (mg/g)	LPS induced NO production (%)	LPS induced PGE ₂ production (%)
1	45.50	41.51	63.51	61.92
2	42.33	43.89	66.09	70.69
3	49.74	36.51	77.73	74.25
4	45.96	44.54	71.56	71.08
5	46.62	40.91	69.87	70.28
6	41.94	43.65	80.01	80.55
7	50.77	37.22	76.53	78.59
8	45.92	43.47	68.88	69.62
9	47.31	35.38	73.45	73.29
10	38.95	43.53	74.05	74.82
11	45.95	41.45	64.90	63.81
12	51.69	40.49	73.35	72.31
13	46.45	43.89	71.86	73.27
14	47.04	47.16	81.70	81.17
15	48.43	42.58	72.16	72.58
16	48.29	42.82	70.97	72.17
17	47.62	43.89	71.36	71.49
18	47.68	42.88	73.05	72.31
19	48.43	43.89	72.76	71.36
20	48.06	43.59	72.76	72.72

Table 36. Predicted levels of optimum conditions for the maximized and minimized responses of variables by the ridge analysis of their response surface.

Responses	X ₁	X ₂	X ₃	Estimated responses	Morphology
Yield (%)	94.21	48.30	5.26	(min)	saddle point
	43.94	74.01	5.40	(max)	
Total phenolics (mg/100g)	19.30	62.52	4.71	(min)	saddle point
	65.75	52.27	8.85	(max)	
LPS induced NO production (%)	42.67	33.47	3.26	(min)	saddle point
	68.08	45.15	8.55	(max)	
LPS induced PGE ₂ production (%)	37.10	34.00	3.60	(min)	saddle point
	60.21	48.16	8.90	(max)	

X₁: EtOH (%), X₂: Extraction temperature (°C), X₃: Extraction time (hr).

(8) 최적 추출조건 예측

- 팔삭 과피의 최적 추출조건을 설정하기 위하여 NO 와 PGE₂ production을 모두 만족시킴과 아울러 주원료로서의 경쟁성 측면을 함께 고려하여 최적 추출조건을 얻고자 각 반응표면을 superimposing하여 Fig. 126에 나타내었다. 이 반응표면으로부터 설정될 수 있는 최적조건 범위는 Fig 126에서 중첩되는 부분으로써 Table 37에 최적조건을 나타내었다. 즉, 팔삭 과피의 추출 최적 범위는 추출온도 30~54°C, 에탄올 농도 20~40% 및 추출시간 2~7시간으로 나타났다.

Table 37. The range of optimum extraction condition for maximum response variables by superimposing response surface of NO and PGE₂ production in *Citrus hassaku* pericarp extract.

Extraction Condition	Range of predicted condition (optional point)
Extraction temperature (°C)	30~54 (42)
EtOH (%)	20~40 (30)
Extraction time (hr)	2~7 (4.5)

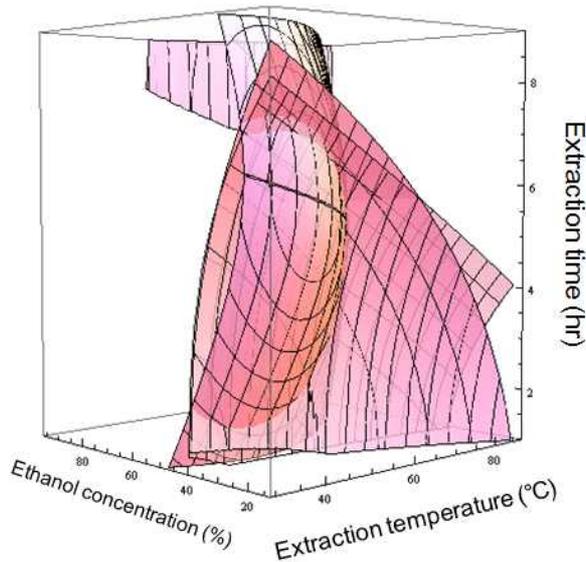


Figure. 129. Superimposed response surface for optimization of NO and PGE₂ production of *Citrus hassaku* pericarp extract as a function of extraction temperature, ethanol ratio and extraction time.

4. 항염증 활성이 우수한 기능성음료를 위한 재래감귤 팔삭 및 구아바, 인진호의 배합비 최적화

- 혼합물 실험계획법(mixture design)은 식품의 개발과 최적화를 위한 중요한 방법으로 사용된다. 여러 개의 성분으로 혼합이 되는 경우 각 성분의 혼합량이 문제가 되는 것이 아니라 각 성분의 혼합비율 (mixing proportion)만이 문제가 되는 경우가 있다. 이처럼 몇 개 성분의 혼합물 (mixture)에 관한 실험에서 어떠한 성분이 목적하는 종속변수에 유의한 영향을 미치며, 종속변수의 반응량을 최대 또는 최소로 만드는 최적혼합비율을 찾고자 하는 실험이 혼합물 실험이다. 따라서 본 연구에서는 혼합물 실험계획을 이용하여 항염증 활성 증진을 위한 팔삭과피 및 구아바, 인진호 추출물의 최적 혼합비율을 찾고, 이를 기초로 재래감귤 팔삭, 구아바, 인진호를 이용한 고부가가치 혼합조성물 개발 및 제품화를 위한 자료를 제시하고자 하였다.

가. 재료 및 방법

(1) 재료

- 부원료인 구아바 및 인진호는 1차년도 연구결과에서 얻어진 추출조건에서 추출하였으며 주원료인 재래감귤 팔삭의 초임계추출물은 제주대학교에서 제공받아 본 실험에 사용하였다. 각 추출물은 MTT assay를 통하여 세포독성이 나타나지 않는 농도로 희석하여 혼합물 실험계획에 사용하였다.

(2) NO 생성량 측정

- NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess reagent를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cells를 1×10^5 cells/well로 96 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 각 혼합물로 전처리하고 2시간 후 LPS (1 ug/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양 상등액 100 uL를 96 well plate에 취하고, 여기에 동량의 Griess reagent를 넣어 10분간

상온에서 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

(3) PGE₂ 생성량 측정

- RAW 264.7 cells를 6 well plate에 1x10⁶ cells/ml의 세포수가 되도록 분주하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 새로운 RPMI 1640배지로 교환 후 각 혼합물로 세포에 전처리하고 2시간동안 배양한 후 LPS (1 ug/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 5,000 rpm에서 3분 동안 원심분리 하여 분리된 상층액을 PGE₂ enzyme immune assay (EIA) kit (R&D Systems, Abington, UK)을 사용하여 PGE₂ 양을 측정하였다.

(4) 재료 혼합비율의 최적화를 위한 실험 디자인

- 실험의 설계, 데이터 분석 및 최적화는 통계소프트웨어인 미니탭 (MINITAB ver. 18)을 사용하였고, 실험계획법 중 혼합물 설계 (mixture design)에 따라 설계하였다. 독립 변수로는 팔삭의 과피 초임계추출물 (A), 구아바 잎 추출물 (B), 인진호 추출물 (C)로 설정하였으며 혼합물 실험에서 팔삭의 과피 추출물이 적어도 50%이상 되어야 한다는 혼합비율에 대한 하한제약을 설정하였다. 이와 같이 제약조건을 갖는 시료의 성분비에 따라 혼합물 설계 중 심플렉스 중심 설계(Simplex Centroid Design)를 사용하였고, 전체설계의 설정 반복은 1회로 한정하였다. 혼합물 총량을 1로 두었을 때 각 성분 별 한계를 다음 식(1)과 같이 제약하였다.

식(1)

$$X1 + X2 + X3 = 1$$

$$0 \leq X1 \leq 0.5$$

$$0 \leq X2 \leq 1.0$$

$$0 \leq X3 \leq 1.0$$

- 여기서, 식(1)에서 X1은 팔삭 과피의 초임계추출물을 X2는 구아바 잎 추출물을, X3는 인진호 추출물을 각각 나타낸다. 미니탭의 혼합물 설계를 이용하여 각 설정된 범위를 입력하였을 때 축과 중심으로 10개의 실험점이 설정되었으며 (Fig. 130), 실험점의 재료 혼합비율은 Table 38과 같고, 모든 실험순서(run)는 구획에 따른 오차를 없애기 위하여 무작위로 실행하였다.

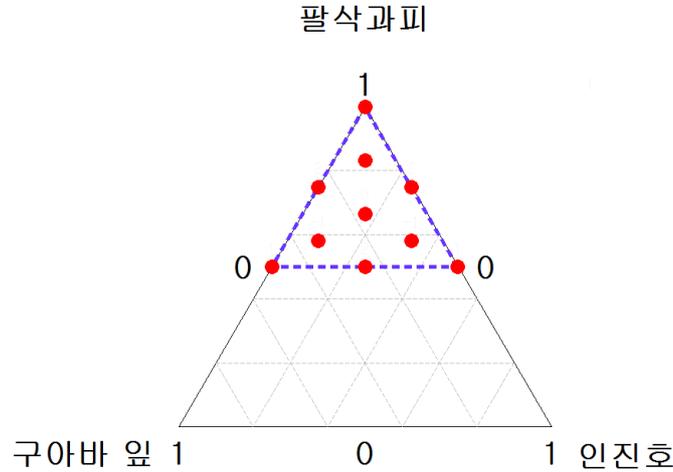


Figure. 130. Simplex design plot by mixture design.

(5) 통계처리

- 본 연구의 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 각 그룹 간 통계적 유의성은 IBM SPSS Statistics 20.0 program을 이용하여 one-way ANOVA 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

나. 혼합물 설계 분석

(1) 농도별 세포생존율의 변화

- 혼합 추출물 (팔삭, 구아바, 인진호)이 마우스 대식세포인 RAW 264.7의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 각 추출물들을 농도별 (20, 40, 60, 80, 90농도, v/v) 24시간 동안 처리 한 결과는 Fig. 131과 같았다. 혼합 추출물의 농도 60%에서는 1, 2, 3, 4, 5번 구간에서 대조군보다 세포생존율이 유의적으로 감소하였고, 추출물의 농도 80%에서 부터는 모든 구간에서 세포생존율이 유의적으로 감소하였다. 모든 구간에 0 - 9농도별 세포생존율을 측정 결과 추출물의 농도 40%에서 독성이 나타나지 않아 NO 동PGE₂ 분석에 이용하였다.

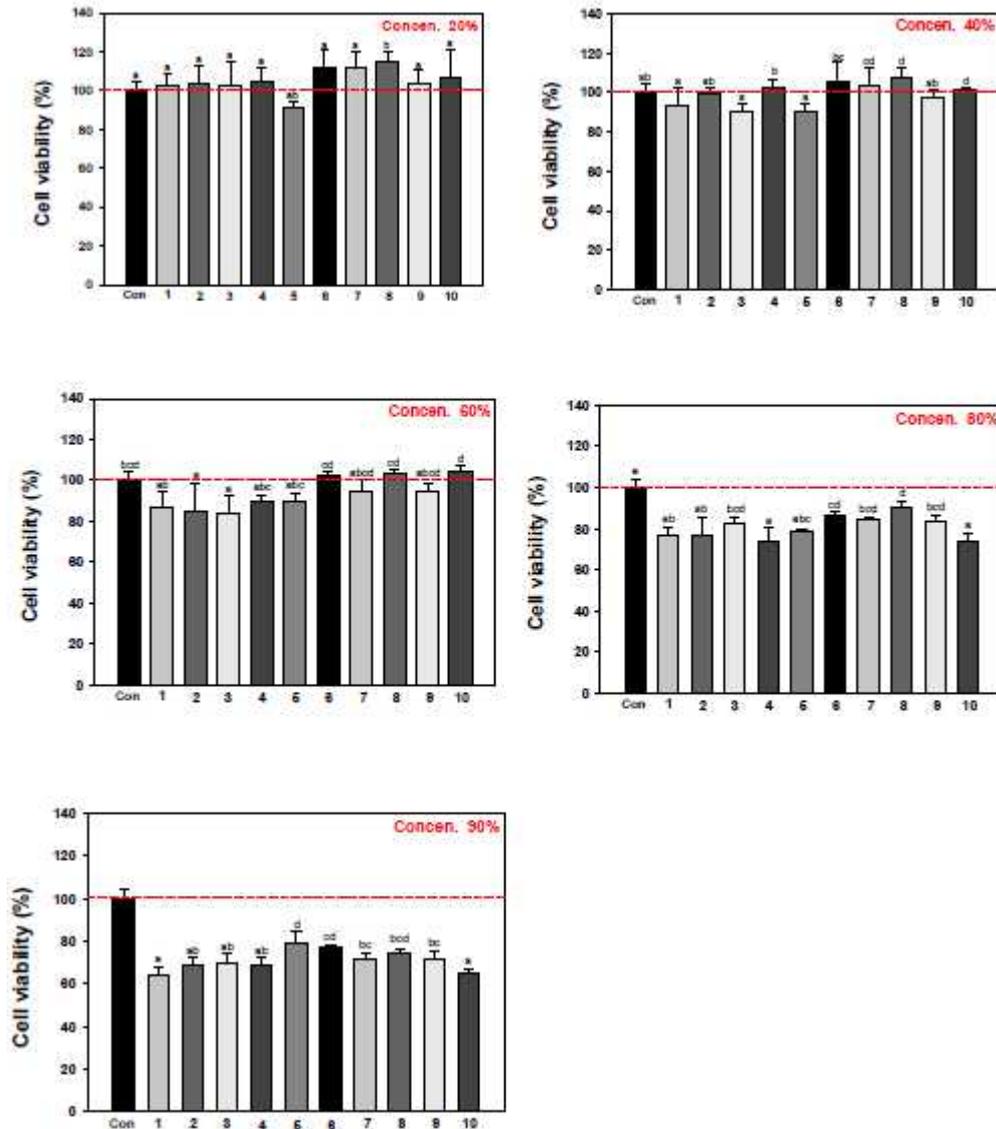


Figure. 131. Effect of ethanolic extracts from mixture (*Citrus hassaku* pericarp, *Psidium guajava*, and *Artemisia capillaris* Thumb extract) on cell viability in RAW 264.7. Each column represents the mean±standard deviation(n=3).

Table 38. Experimental variables and responses used in the simplex-centroid mixture design.

Std order	Run order	Pt type	Block	X ₁ ^{a)}	X ₂ ^{b)}	X ₃ ^{c)}	Y ₁ ^{d)}	Y ₂ ^{e)}
1	9	1	1	1.0000	0.0000	0.0000	43.12	63.61
2	2	1	1	0.5000	0.5000	0.0000	40.60	63.98
3	4	1	1	0.5000	0.0000	0.5000	45.35	67.08
4	3	2	1	0.7500	0.2500	0.0000	36.00	49.73
5	1	2	1	0.7500	0.0000	0.2500	46.39	63.98
6	10	2	1	0.5000	0.2500	0.2500	39.78	49.83
7	7	0	1	0.6667	0.1667	0.1667	47.58	52.26
8	6	-1	1	0.8333	0.0833	0.0833	38.97	58.16
9	5	-1	1	0.5833	0.3333	0.0833	36.29	56.80
10	8	-1	1	0.5833	0.0833	0.3333	37.56	57.48

a) X₁ : *Citrus hassaku* pericarp extract.

b) X₂ : *Psidium guajava* extract.

c) X₃ : *Artemisia capillaris Thumb* extract.

d) Y₁ : NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells.

e) Y₂ : PGE₂ production in LPS-induced RAW 264.7 cells.

(2) 혼합 추출물에 대한 NO 생성량

- 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포에 10개의 실험점으로 만든 각각의 혼합추출물을 처리한 후 LPS로 유도하여 생성된 염증관련인자인 NO를 측정된 결과는 Table 38와 같았다. 각 조건에 따른 NO 생성량은 36.00 - 47.58%를 나타내었으며 1차년도 연구결과에서 얻어진 구아바 잎 및 인진호 최적 추출물의 NO 생성량인 45.81 ± 0.62%, 57.79 ± 0.82% 보다 낮아 혼합 추출물이 NO 생성량을 더 효과적으로 억제시키는 것으로 나타났다.
- 염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 필연적으로 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등 외부물질에 노출되면 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응을 가속시킨다. 이러한 인자 중 nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성

면역반응에 관여하는데 특히 대식세포가 lipopolysacchride (LPS)와 interferon- γ (IFN- γ)로 자극될 때 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 많은 양의 NO는 염증반응 매개물질의 역할을 하게 된다.

- 미니탭의 혼합물 설계 분석을 이용하여 실험 결과에 대한 분석을 실시하였다. 팔삭 과피, 구아바 및 인진호 혼합물의 NO생성량에 대한 혼합물 분석 결과와 등고선도 및 표면도는 Fig. 132와 Fig. 133에 나타내었다. Fig. 133 (A)는 선형회귀 함수식으로부터 계산된 독립변수와 종속변수간의 관계를 시각적으로 보여주는 등고선도이며 이러한 등고선도 및 표면도(B)를 통해 유의성분과 반응인자 간의 관계를 파악하고 도출하고자 하는 최적조건의 위치를 개괄적으로 알 수 있다. Fig. 132에서 팔삭*구아바의 p 값이 0.045이었으며 구아바*인진호의 p 값은 0.050로 나타나 5% 이내에서 유의성을 보였다. Fig. 133 (A)에서는 팔삭과 구아바의 양이 많을수록 인진호의 양이 적을수록 NO 생성량이 낮아짐을 알 수 있었다. 회귀분석 결과를 보면 선형모형의 데이터 적합도가 R-제곱 = 90.04%로써 데이터가 선형모형에 다소 유의하며 회귀분석 결과 $p = 0.039$ 와 선형계수도 $p = 0.078$ 로 비교적 유의한 수준을 보였다.

혼합물에 대한 회귀 분석: NO 대 팔삭, 구아바, 인진호						
NO production (유사 성분)에 대한 추정된 회귀 계수						
항	계수	SE 계수	T	P	VI	
팔삭	39.04	1.420	*	*	1.964	
구아바	40.62	1.420	*	*	1.964	
인진호	45.18	1.420	*	*	1.964	
팔삭*구아바	-18.86	6.547	-2.88	0.045	1.982	
팔삭*인진호	2.45	6.547	0.37	0.728	1.982	
구아바*인진호	-18.17	6.547	-2.78	0.050	1.982	
S = 1.47283 PRESS = 133.944						
R-제곱 = 90.04% R-제곱(예측) = 0.00% R-제곱(수정) = 77.58%						
NO production에 대한 분산 분석(유사 성분)						
출처	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
회귀 분석	5	78.4165	78.4165	15.6833	7.23	0.039
선형	2	43.5661	22.3454	11.1727	5.15	0.078
2차	3	34.8503	34.8503	11.6168	5.36	0.069
팔삭*구아바	1	17.8140	17.9951	17.9951	8.30	0.045
팔삭*인진호	1	0.3314	0.3031	0.3031	0.14	0.728
구아바*인진호	1	16.7050	16.7050	16.7050	7.70	0.050
잔차 오차	4	8.6769	8.6769	2.1692		
총계	9	87.0933				
NO production(성분 양)에 대한 추정된 회귀 계수						
항	계수					
팔삭	39.0445					
구아바	79.9015					
인진호	46.4215					
팔삭*구아바	-75.4231					
팔삭*인진호	9.78901					
구아바*인진호	-72.6691					

Figure. 132. Analysis result of the regression and variance for NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells.

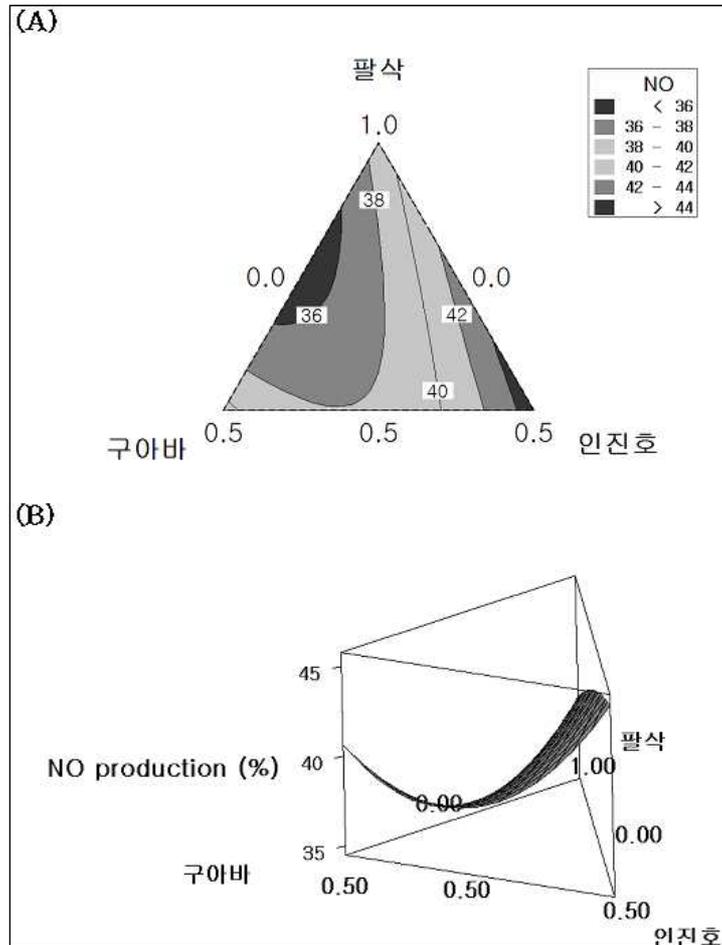


Figure. 133. (A) Triangular-dimensional contours diagrams for the effect of *Citrus hassaku* pericarp (X_1), *Psidium guajava* (X_2), and *Artemisia capillaris* Thumb (X_3) on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The contour line show % PGE_2 production. The contour line show % NO production. (B) Response surface (3D) showing the effect of different combinations of *Citrus hassaku* pericarp, *Psidium guajava*, *Artemisia capillaris* Thumb extract on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells.

(3) 혼합 추출물에 대한 PGE_2 생성량

- 10개의 실험점으로 만든 각각의 혼합 추출물을 RAW264.7 세포에 처리후 LPS로 염증을 유발하였을 때 생성되는 PGE_2 를 측정된 결과는 Table 38와 같았다.
- COX-2에 의해 생성되는 PGE_2 의 합성은 non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs)에 의해 억제되어 해열, 진통, 항염 작용 등에 응용되며 항염증제로 류마티즘성 관절염, 골관절염, 강직성 척추염 같은 근육 골격질환에 사용된다. PGE_2 는 주요 염증매개인자로서 혈관 투과성을 증가 시켜 염증부위의 열, 부종과 통증을 유발할 수 있다. 미니탭의 혼합물 설계 분석을 이용하여 실험 결과에 대한 분석을 실시하였다. 팔삭 과피 및 구아바 잎, 인진호 혼합 추출물의 PGE_2 생성량에 대한 혼합물 분석 결과와 표면도는 Fig. 134과 Fig. 135에 나타내었다. Fig. 134에서 팔삭*구아바의 p 값이 0.011이었으며 구아바*인진호의 p 값은 0.006으로 나타나 5% 이내에서 높은 유의성을 보였다. Fig. 135 (A)에서 세 가지 성분 중에서 두 가지를 혼합한 추출물이 반응인자

에 유의한 영향을 미치며 팔삭*구아바, 구아바*인진호의 경우에는 두 성분의 성분비에 따라 반응인자가 달라지는 것으로 나타났다. 회귀분석 결과를 보면 선형모형의 데이터 적합도가 R-제곱 = 93.07%로써 높은 신뢰성을 보이며 회귀분석 결과 $p = 0.020$ 으로 비교적 유의한 수준을 보였다.

혼합물에 대한 회귀 분석: PGE2 대 팔삭, 구아바, 인진호						
PGE2 production (유사 성분)에 대한 추정된 회귀 계수						
항	계수	SE 계수	T	P	VF	
팔삭	63.55	2.391	*	*	1.964	
구아바	64.80	2.391	*	*	1.964	
인진호	66.51	2.391	*	*	1.964	
팔삭*구아바	-49.83	11.020	-4.52	0.011	1.982	
팔삭*인진호	-1.82	11.020	-0.17	0.877	1.982	
구아바*인진호	-57.40	11.020	-5.21	0.006	1.982	
S = 2.47915 PRESS = 329.604						
R-제곱 = 93.07% R-제곱(예측) = 7.03% R-제곱(수정) = 84.40%						
PGE2 production에 대한 분산 분석(유사 성분)						
출처	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
회귀 분석	5	329.937	329.937	65.987	10.74	0.020
선형	2	39.166	4.864	2.432	0.40	0.697
2차	3	290.771	290.771	96.924	15.77	0.011
팔삭*구아바	1	123.893	125.699	125.699	20.45	0.011
팔삭*인진호	1	0.109	0.168	0.168	0.03	0.877
구아바*인진호	1	166.769	166.769	166.769	27.13	0.006
잔차 오차	4	24.585	24.585	6.146		
총계	9	354.521				
PGE2 production(성분 양)에 대한 추정된 회귀 계수						
항	계수					
팔삭	63.5505					
구아바	165.728					
인진호	73.1166					
팔삭*구아바	-199.339					
팔삭*인진호	-7.28365					
구아바*인진호	-229.606					

Figure. 134. Analysis result of the regression and variance for PGE₂ production in LPS-induced RAW 264.7 cells.

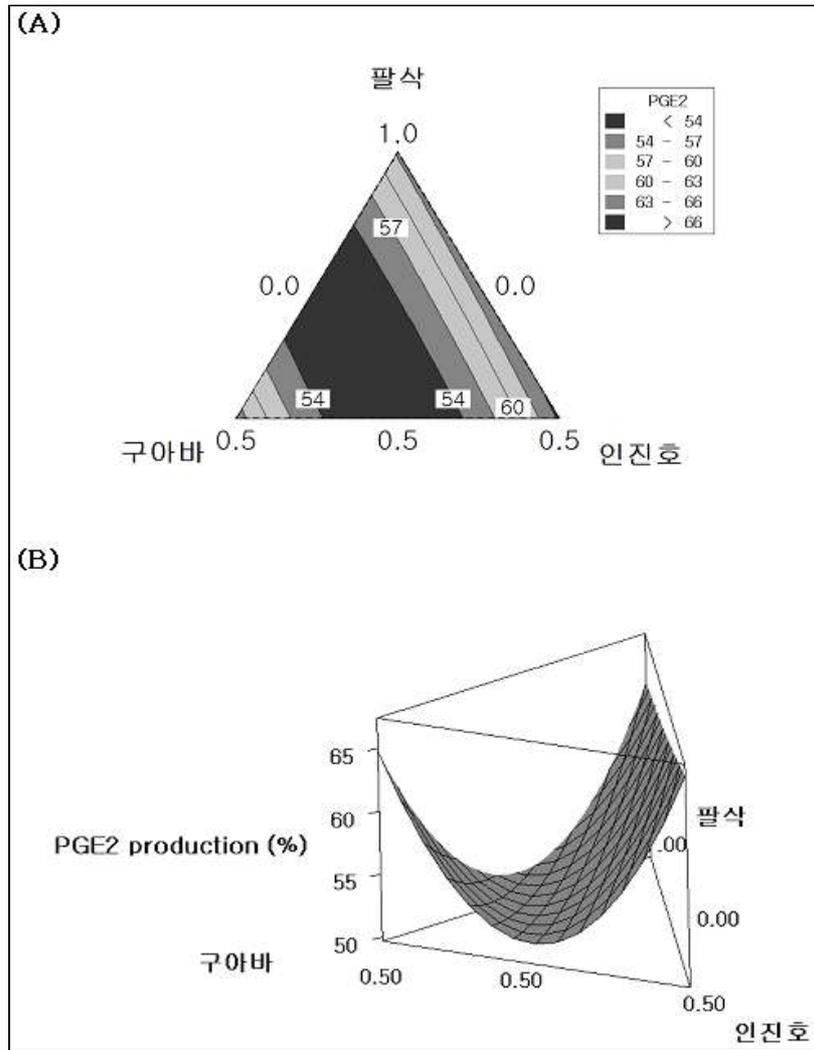


Figure. 135. (A) Triangular-dimensional contours diagrams for the effect of *Citrus hassaku* pericarp (X1), *Psidium guajava* (X2), and *Artemisia capillaris* Thumb (X3) on PGE₂ production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The contour line show % PGE₂ production. (B) Response surface (3D) showing the effect of different combinations of *Citrus hassaku* pericarp, *Psidium guajava*, *Artemisia capillaris* Thumb extract on PGE₂ production in LPS-induced RAW 264.7 cells.

(4) 반응의 최적화

- 실험계획법의 목적 중 하나는 독립인자들의 최적 수준을 찾아내는 것이다. 혼합물 설계에서 최적화 기법(Optimization Technique)은 매 단계에서 실험점에 대한 반응변수 값을 구한 후 점점 최적화되는 방향으로 이동하면서 인자들의 최적수준을 찾는 방법이다. NO 및 PGE₂ 생성량을 최소화할 수 있는 팔삭, 구아바 및 인진호의 최적 혼합비율을 예측하기 위하여 Minitab software의 반응 최적화 도구를 이용하여 혼합비를 탐색하였다. 먼저 NO 생성량의 최소화 경우 Fig. 133 (A)와 Table 38의 결과를 근거로 하여 망소 특성의 목표 값을 35.0으로 설정하였으며 허용 가능한 최대 반응 값인 상한 값은 48.0으로 설정하였다. PGE₂ 생성량의 최소화 경우에도 Fig. 135 (A)와 Table 38의 결과를 근거로 하여 망소 특성의 목표 값을 48.0으로 허용 가능한 최대 반응 값인 상한

값을 68.0으로 정하였다. NO 및 PGE₂ 생성량의 가중치는 1로 설정하여 목표값과 한계값에 동등한 중요도를 부여하였고 NO 및 PGE₂ 생성량의 중요도의 경우 모든 반응이 똑같이 중요하기 때문에 각 반응의 중요도는 기본값 1로 설정하였다. 상기 조건을 이용하여 반응 최적화 도구를 실행한 결과, 최적 조건은 팔삭과피의 초임계 추출물(X₁), 구아바 잎 추출물(X₂), 인진호 추출물(X₃)이 각각 75.9%, 24.1%, 0.0%로 나타났다. 이 혼합조건에서 혼합 추출물의 NO 및 PGE₂ 생성량은 각각 35.1%, 51.7%로 나타났다 (Fig. 76). NO 생성량의 개별 만족도(d)는 0.99로 나타났으며 NO 생성량의 개별 만족도 0.81로 개별만족도를 결합한 종합만족도(D)는 0.90으로 높은 만족도를 나타냈다.

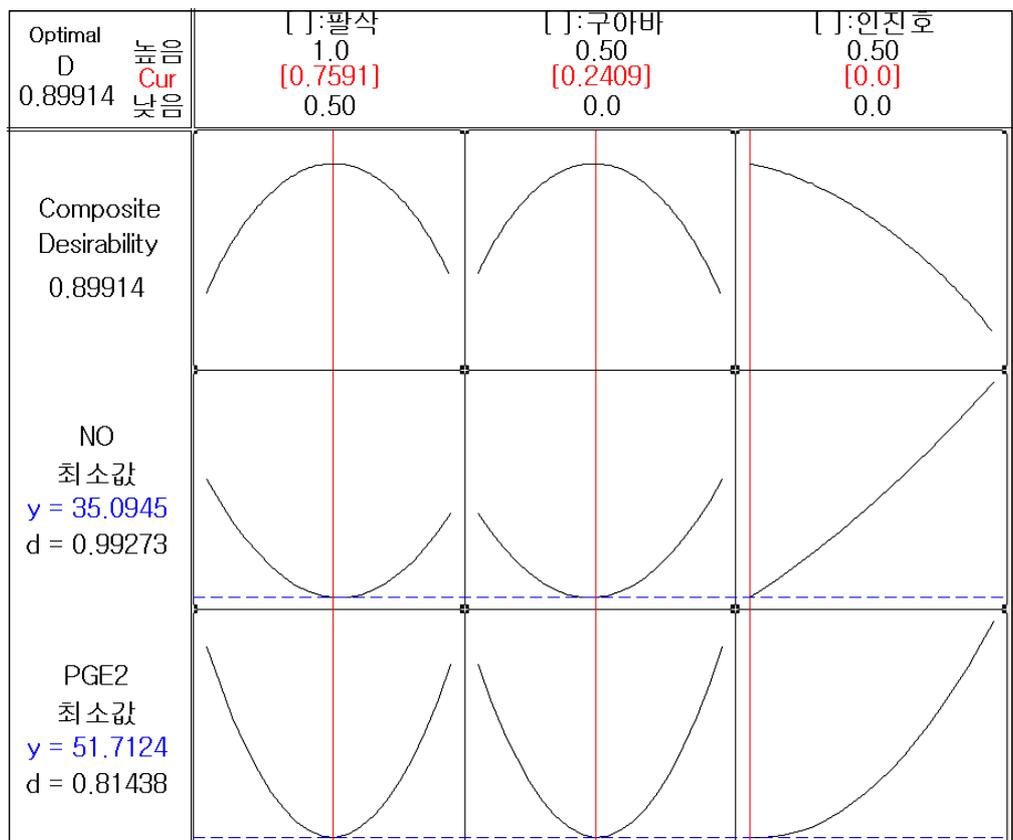


Figure. 136. Optimization mixing proportion and composite desirability for responses of NO production and PGE₂ production.

5. 팔삭-구아바 혼합제제의 정제 타정용 시료 조제 및 구성약물의 품질표준화

가. 추출물 제조 및 성분 분석

(1) 팔삭과피 추출물의 제조

- 팔삭 과피를 가정용 믹서기로 분쇄하여 531.3 g을 칭량한 뒤 3 L 초임계 추출조에 넣고 초임계 이산화탄소 추출장비를 이용하여 추출하였다. 추출조의 하부로부터 이산화탄소를 고압기체 펌프(Haskel Gas Booster, Model No.: AGT-30/75)를 이용하여 300기압까지 주입하며 추출조의 내부온도는 50 °C를 유지한다. 추출기 상부에 도출 밸브를 열어 추출물을 회수조를 통해서 받고 내부압력과 온도가 300기압과 50 °C를 유지하도록 고압기체 펌프를 조절하였다. 총 3시간 추출을 진행하여 더 이상 추출물이 생성되지 않음을 확인하였고 이때 사용된 CO₂의 양은 19Kg(유속:분당 0.1Kg)이었다. 수분이 함유된 crude 추출물 19.77 g을 수득하였다.

(2) 구아바 잎 추출물의 제조

- 제주대학교로부터 입수한 구아바 잎을 건조·마쇄한 후 20 mesh 체를 통과시켜 사용하였다. 시료의 20배 중량의 55% 에탄올 수용액을 사용하여 47 °C에서 4.5시간 동안 환류추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압농축기로 45 °C 이하에서 농축하여 동결 건조하였다.

(3) UPLC-ESI-MS/MS을 통한 구아바 추출물의 페놀성 성분 분석

- 구아바 잎의 생리활성물질인 phenolic compounds 11종 (gallic acid 및 (+)-catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin hydrate, luteolin 7-glucoside, p-coumaric acid, myricetin, quercetin, luteolin, kaempferol)의 함량은 UPLC-ESI-MS/MS을 이용하여 분석하였다. 분석에 사용한 기기는 Waters ultra high performance liquid chromatography system (Waters Inc., Milford, MA, USA)과 electro spray ionization tandem mass spectrometry(Quattro Premier XE)이며 분석용 column은 Kinetex C18(100 mm × 2.1 mm × 2.6 μm, Phenomenex, Inc., Torrance, CA)을 사용하였다. 이동상은 solvent A (0.1% formic acid in water)와 solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile)을 사용하여 0.25 mL/min의 유속으로 0-1분 (A 90%, B 10%), 1-5분(A 50%, B 50%), 5-8분 (A 0%, B 100%), 8-10분 (A 90%, B 10%)으로 용매구배의 방법으로 전개하였다. LC-MS/MS는 분석 대상 phenolic compounds 11종을 측정하기 위하여 electron spray ionization (ESI) source로 장착된 MS system은 negative ion mode로 측정하였으며 multiple reaction monitoring (MRM) scan mode의 조건은 다음과 같다: Ccapillary voltage (3.20 kV), cone voltage (30 V), source temp. (120 °C), desolvation temp. (300 °C), collision gas flow (0.22 mL/min). LC-MS/MS 분석 대상 phenolic compounds 11종에 대한 MRM 조건은 Table 39에 나타내었다.

Table 39. UPLC-ESI-MS/MS parameters for selected phenolic compounds in the negative mode.

Compound	RT ^a (min)	Mr	MS/MS ions m/z (relative abundance, %)	MRM (m/z)	D.P. (V)	C.E. (V)
Gallic acid	1.19	170	125 (100), 81 (7)	169 > 125	20	13
(+)-Catechin	2.39	290	109 (100), 125 (67), 245 (65)	289 > 109	35	25
Chlorogenic acid	2.42	354	191 (100), 85 (10)	353 > 191	20	13
Caffeic acid	2.67	180	135 (100), 134 (4)	179 > 135	40	11
Rutin hydrate	2.88	610	300 (100), 301 (26), 271 (14)	609 > 300	40	40
Luteolin 7-glucoside	2.97	448	284 (100), 133 (4)	447 > 284	40	40
p-Coumaric acid	3.06	164	119 (100), 93 (4)	163 > 119	30	20
Myricetin	3.32	318	151 (100), 137 (57)	317 > 151	40	25
Quercetin	3.67	302	151 (100), 179 (11)	301 > 151	40	25
Luteolin	3.67	286	133 (100), 107 (10), 151 (3)	285 > 133	50	40
Kaempferol	3.99	286	117 (100), 187 (22)	285 > 117	30	40

^a RT: retention time; MRM: multiple reaction monitoring; DP: declustering potential; CE: collision energy.

나. 인체적용시험의 섭취량 설정

- 인체적용시험의 섭취량을 설정하기 위해서 경희대학교 안광석 교수님이 제공해주신 동물실험 결과를 토대로 효과를 보이는 최소한의 용량을 외삽법(extrapolation)을 활용하여 인체적용시험의 섭취량을 설정하였다. 동물실험 결과 팔삭과피 초임계 추출물과 구아바 잎 추출물을 3:1 비율로 만든 혼합제재를 마우스에 500 mg/kg B.W.의 농도로 하루 1회 경구 투여한 결과, 최소한의 용량으로 대조군에 비해 유의적인 결과가 나타나 500 mg/kg B.W./day를 인체에서의 섭취량으로 환산하고자 하였다. Table 40에 나타낸 바와 같이 마우스에서 인체로의 체표면적대비 환산계수 0.08을 사용하여, 500 mg/kgB.W./day는 40 mg/kgB.W./day로 환산되며 동물종 사이의 감수성의 차 1/10과 인간에 있어서의 감수성의 차 1/10인 안전계수 1/100을 곱한 0.4 mg/kg B.W./day을 인간의 1일 섭취허용량 (ADI)으로 하였다. 성인 체중 60 kg 적용시 24 mg/day로 환산되어진다. 이와 같이 산출된 섭취량에 안전계수를 적용하여 최종적으로 해당원료에 맞는 섭취량을 설정하였으며 이를 근거로 정제의 배합비율 및 배합량에 적용하였다.

Table 40. Conversion of Animal Doses to Human Equivalent Doses Based on Body Surface Area*.

Species	To Convert Animal Dose in mg/kg to Dose in mg/m ² , Multiply by km	To Convert Animal Dose in mg/kg to HED ^a in mg/kg, Either:	
		Divide Animal Dose By	Multiply Animal Dose By
Human	37	---	---
Child (20 kg) ^b	25	---	---
<u>Mouse</u>	<u>3</u>	<u>12.3</u>	<u>0.08</u>
Hamster	5	7.4	0.13
Rat	6	6.2	0.16
Ferret	7	5.3	0.19
Guinea pig	8	4.6	0.22
Rabbit	12	3.1	0.32
Dog	20	1.8	0.54
Primates:			
Monkey ^c	12	3.1	0.32
Marmoset	6	6.2	0.16
Squirrel monkey	7	5.3	0.19
Baboon	20	1.8	0.54
Micro-pig	27	1.4	0.73
Mini-pig	35	1.1	0.95

* Guidance for Industry - Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. FDA

^a Assumes 60 kg human. For species not listed or for weights outside the standard ranges, HED can be calculated from the following formula:

$$\text{HED} = \text{animal dose in mg/kg} \times (\text{animal weight in kg} / \text{human weight in kg})^{0.33}$$

^b This km value is provided for reference only since healthy children will rarely be volunteers for phase 1 trials.

^c For example, cynomolgus, rhesus, and stump-tail.

다. 정제(tablet)의 제조방법 및 특성평가

(1) 정제의 제조 공정

- 우선 정제를 만들기 위해 필요한 각 원료들을 Table 41에 나타낸 바와 같이 배합단위에 맞춰 계량한 후 [STEP 1], 구아바 잎 추출물 및 유당혼합분말, 결정셀룰로오스를 배산 후 F형 과립기를 이용하여 24 mesh로 사별하였다 [STEP 2]. 구아바 잎 추출물의 경우 들어가는 함량이 적어 유당혼합분말과 결정셀룰로오스를 1:1 비율로 균일하게 배산한 후 Table 41에 나타낸 비율에 맞게 배산하였다. 팔삭과피 초임계 추출물의 경우 기체와 액체의 중간적인 독특한 물성을 가지고 있기 때문에 물에는 녹지 않아 85% 주정에 용해하였으며 여기에 히드록시프로필셀룰로오스(HPC)를 넣어 잘 혼합하였다. 주정에 완전히 용해시킨 팔삭과피 결합액은 STEP 2의 원료들과 균일하게 혼합하기 위한 스프레이 분사 전 단계이다 [STEP 3]. STEP 2의 사별물을 하이스피드 믹서에 넣고 agitator 속도 4 rpm, chopper 속도 5 rpm에 맞춰 5분간 혼합시켜 주었다 [STEP 4]. STEP 3에서 팔삭과피 결합액을 혼합물[STEP 4]이 들어 있는 하이스피드믹서에 넣고 agitator 속도 5 rpm, chopper 속도 6 rpm에 맞춰 5분간 스프레이 분사를 통해 연합하였다 [STEP 5]. 독특한 물성으로 주정에 녹인 팔삭과피 초임계 추출물과 구아바 잎 혼합물의 균일한 혼합을 위해 스프레이 분사를 하였다. 다음의 연합물을 F형 과립기를 이용하여 18 mesh로 제립한 후[STEP 6] 건조기를 이용하여 수분함량이 약 2.5% (2.1% ~ 2.9%)가 되도록 건조하였다. 수분의 존재는 화학적으로나 물리적으로 불안정한 부분으로 공정 트러블이 발생하기 때문에 수분함량을 조절해야하므로 본 연구에서도 건조조건으로 IN LET 온도는 40~55 °C에서 실시하였으며 시료 5 g을 105 °C에서 5분 동안 건조하여 수분함량이 2.1% ~ 2.9% 범위 내에 들도록 하였다 [STEP 7]. 이 건조한 과립물을 F형 과립기를 이용하여 18 mesh로 정립하였다[STEP 8]. 점도 증가 및 물성 향상을 위한 식품첨가물인 카르복시메틸셀룰로오스칼슘은 STEP 8의 정립물을 이용하여 1:1로 배산한 후 18 mesh로 사별하였으며 이를 2회 진행하였다 [STEP 9]. 사별한 분말과 STEP 8의 정립물을 더블 콘믹서에 넣고 20분간 혼합한 후 스테아린산 마그네슘분말과 이산화규소분말을 배산하여 24 mesh로 사별한 것을 혼합물이 들어있는 더블콘믹서에 넣고 3분간 더 혼합하였다 [STEP 10]. 균일하게 혼합된 원료들은 타정기를 이용하여 타정하였으며 Table 41에 나타낸 바와 같이 개별 타정의 중량은 500.00 mg이었다. 팔삭과피-구아바 잎 추출물 혼합제제의 정제의 제조공정도에 대한 내용은 Fig. 137에 나타낸 바와 같다.

Table 41. Composition of uncoated Hassaku-guava tablet.

Ingredient	Ratio of per tablet (%)	Quantity of per tablet (mg)
Hassaku extract	0.50	2.50
Guava leaves extract	0.20	1.00
Cellulose, microcrystalline	30.70	153.50
Lactose	62.50	312.50
Calcium carboxymethylcellulose	1.50	7.50
Hydroxypropyl methylcellulose	1.50	7.50
Hydroxypropylcellulose (HPC)	1.40	7.00
Magnesium stearate	1.00	5.00
Silicon dioxide	0.70	3.50
Total	100.00	500.00

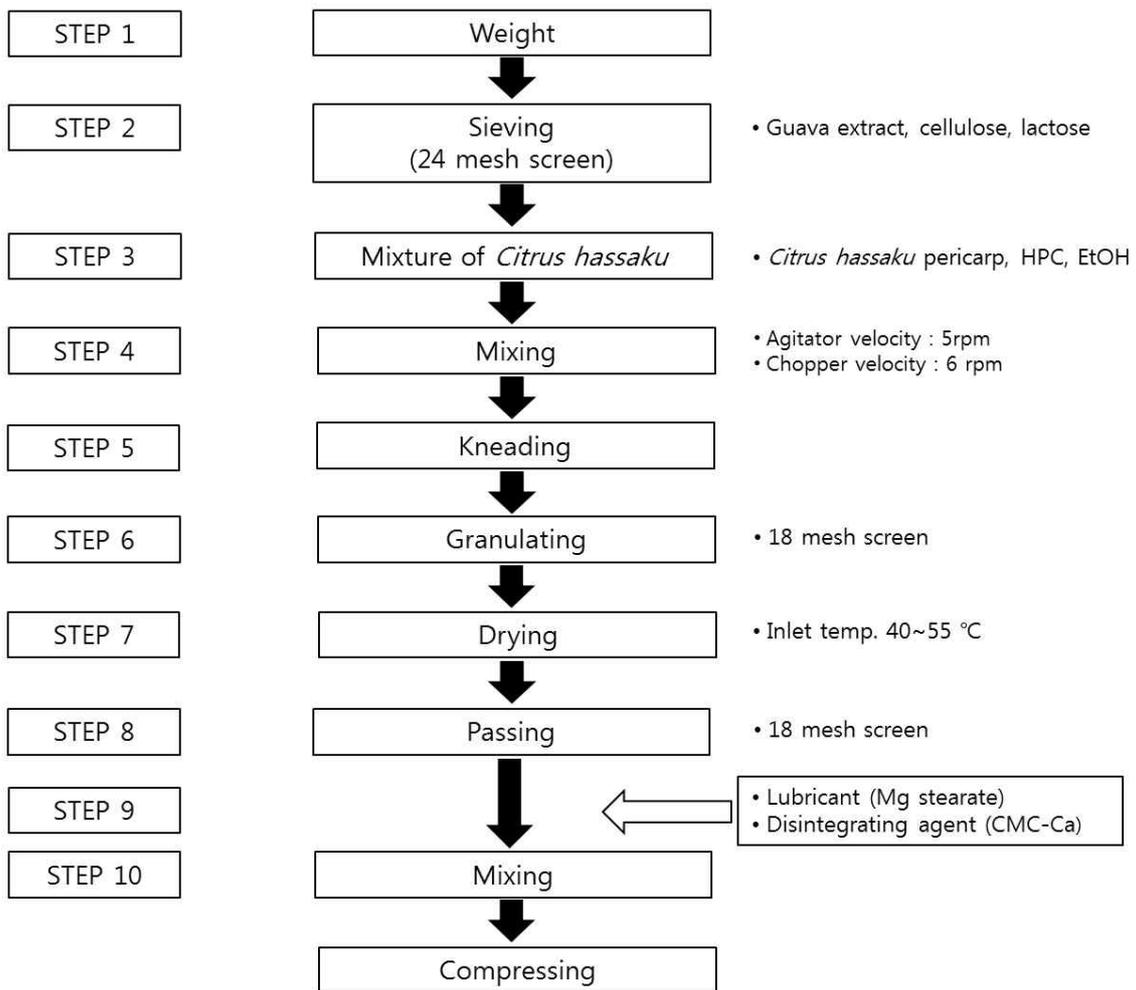


Figure. 137. Manufacturing process of uncoated Hassaku-guava tablet.

(2) 정제의 코팅

- 제조한 나정을 약물의 보존성 및 수분 안정성 유지를 위해 Hi-coater HCT-05 코팅 실험장비(FreundCo.Japan)를 사용하여 고분자로 얇게 코팅하였다. 타정된 팔삭과피-구아바 잎 추출물 혼합제제 나정 각각 400 g 취하여 필름 코팅기제 OPADRY NS 121M190002 CLEAR를 사용하였다. 이에 대한 조성은 인간의 체내에 생체 적합하며 다양한 제제연구에 많이 사용되고 있는 셀룰로오스 계열의 고분자인 hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) 및 glycerin이며 코팅액 농도(solid content of solution)는 10% (w/w)로 80% 주정을 용제로 사용하였으며 50-100 rpm으로 교반시키면서 분무건조하여 제조하였다.

Table 42. Coating's condition for uncoated Hassaku-guava tablet.

Coating room temp. : 18.0 °C, humidity : 30.0 %

Time (min.)	Inlet Temp. (°C)	Exhaust Temp. (°C)	Product Temp. (°C)	Spray rate (g/min)	Pan speed (RPM)	Balance reading (g)	Theoretical weight gain (%)
0	42.0	26.0	27.0	7.50	12.0	0.0	0.00
1	43.0	26.0	25.0	7.50	14.0	7.5	0.19
5	42.0	27.0	25.0	13.13	27.0	60.0	1.50

Atomising air pressure : 1 bar.
Pattern air pressure : 1.2 bar.
Air flow : 140.0 m³/hr.
Inlet warm up temp. : 42.0 °C.
Warm up time : 10.00 min.

(3) 정제(tablet)의 특성 평가

(가) 정제의 중량편차시험

- 중량편차 시험은 정제의 중량의 편차를 함량의 편차로 보고 측정한 개개의 정제 중량으로부터 정제의 중량함량을 추정하는 시험으로 Table 41의 조성에 따라 타정된 정제 20개를 취하여 그 무게를 정밀히 달아 평균 무게를 계산하여 그 값과 개개의 정제의 무게와의 편차가 5%이하인 경우에 적합한 것으로 하였다.

(나) 정제의 경도, 두께, 직경 측정

- 정제의 품질기준 및 공정규격을 위해 PHARMA TEST사의 4 in 1 Fully Automated Tablet Control System을 이용하여 정제의 무게(weigh) 및 두께(thickness), 직경(diameter), 경도(hardness)를 측정하였다.

(다) 정제의 마손도(friability) 측정

- 정제 10개의 초기 무게를 측정한 후 Copley scientific FR 1000 friability tester(Nottingham, UK)를 이용하여 마손도를 측정하였다. 정제를 아크릴 드럼통 안에 투입한 후, 회전속도는 25 rpm에서 100회 회전시켰다. 마손도는 정제로부터 떨어져 나간 파편을 제외한 정제의 무게를 측정하였고, 마손도는 전체 중량에 대한 현재 정제의 무게를 백분율로 표시하여 손실량을 계량 하는 것으로 하였다.

(라) 정제의 붕해도 측정

- 붕해도 시험법은 정제가 시험액 중에 정해진 조건에서 규정시간 안에 붕해하는 가를 확인시험법이다. 붕해시간(disintegration time)은 대한약전 제 9개정에 따라 이루어졌으며 붕해액(disintegration medium)으로써 37 ± 2 °C의 증류수를 사용하였으며 6개 시험관 각각에 정제를 하나씩 두어 실험하였다. 붕해 완료 시점은 6개 시험관에 있는 개개의 정제가 모두 붕해되는 시점으로 하였고, 붕해 완료시점까지의 시간을 붕해 시간으로 하였다. 검체의 잔류물이 유리관 안에 없든가 있더라도 분명하게 원형을 나타내지 않는 연질의 물질일 때, 또는 불용성의 제피 또는 캡슐 피막의 단편일 때 검체는 붕해된 것으로 하였다.

라. 공정별 품질관리에 대한 항염증 활성 및 위생안전성 실험

(1) 항염증 활성에 대한 공정별 총 페놀함량 분석

- 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가지며 플라보노이드와 탄닌이 주성분이다. 이들은 phenolic hydroxyl(OH)기를 갖기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며 항산화 및 항염증, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다. 인체에서 외부물질에 대한 면역반응 과정에서 대량 생산되는 ROS와 반응질소물질 (reactive nitrogen species, RNS) 등 산화적 스트레스를 야기하는 물질들은 생체의 항상성 유지에 필요한 항산화 물질들을 고갈시켜 만성적인 염증질환을 더욱 악화 시킨다. 따라서 본 연구에서는 항산화 활성 및 항염증 효과를 나타내는 총 페놀함량을 분석하여 공정별 항염증 활성에 대한 안정성을 확인하고자 하였다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다. 각 공정별 시료의 추출물에 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 가하여 혼합하였다. 그 다음, 2% Na₂CO₃을 가하여 혼합하고 실온에서 2시간 방치한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 중의 총 폴리페놀 함량은 표준물질인 gallic acid의 검량선으로부터 구하였다.
- 시료로는 Fig. 137에 나타난 STEP 2의 시료인 구아바 혼합물 및 STEP 3에서 수거한 팔삭과피 결합액을 각각 수거하였다. 또한 STEP 5에서의 팔삭과피·구아바 연합물과 이를 건조한 과립물 [STEP 7], 부형제인 스테아린산 마스네슘 및 이산화규소 분말을 첨가하여 배산·사별한 혼합물 [STEP 10], 코팅 전·후의 나정을 각각 수거하여 TPC를 측정하였다. 나정의 코팅하기 전과 코팅한 정제의 TPC를 측정을 위하여 각각 10정씩 막자사발에 곱게 갈아 사용하였으며 이를 5회 반복하여 측정한 평균값을 나타내었다. 각 공정별로 채취한 시료의 사진은 Fig. 140에 나타내었다.

(2) 미생물 검사

- 공정별 시료의 안정성을 확인해보기 위하여 식품공전에 등재된 건조필름법으로 일반세균수 및 대장균, 대장균군, 효모 및 곰팡이의 미생물 검사를 실시하였다. 건조필름배지는 PetrifilmTM aerobic count plate (PAC, 3M), PetrifilmTM coliform count plate (PCC, 3M), PetrifilmTM E. coli/coliform count plate (PEC, 3M), PetrifilmTM yeast and mold count plate (PYM, 3M)을 사용하였다. 제조 공정별로 채취한 시료에 대한 일반세균수 및 대장균, 대장균군, 효모 및 곰팡이의 미생물학적 검사를 하였다. STEP 2의 시료인 구아바 혼합물 및 STEP 3에서 수거한 팔삭과피 결합액을 각각 원료로서 시료를 수거하였다 (Fig. 137). 또한 STEP 5에서의 팔삭과피·구아바 연합물과 이를 건조한 과립물 [STEP 7], 부형제인 스테아린산 마스네슘 및 이산화규소 분말을 첨가하여 배산·사별한 혼합물 [STEP 10], 코팅 전·후의 나정을 각각 수거하여 미생물 검사를 하였다. 나정의 코팅하기 전과 코팅한 정제의 미생물학적 검사를 위하여 각각 10정씩 막자사발에 곱게 갈아 사용한다. 각 공정별로 채취한 시료의 사진은 Fig. 140에 나타내었다. 공정별 시료 1 g과 멸균생리식염수 9 mL를 단계적으로 각각 희석하여 건조필름배지에 접종하고 37 °C에서 1~2일간 배양한 후 생성된 적색 콜로니를 일반세균으로 계수하였다. 대장균군 수의 측정을 위해 사용한 PCC는 배양액을 film 사이에 접종한 후 35 °C에서 배양하여 24시간 후에 가스방울이 붙어 있는 적색 콜로니를 계수하였다. 대장균 수의

측정을 위해 배양액을 PEC film 사이에 접종한 후 35 °C에서 배양하여 24-48시간 후에 가스방울이 붙어 있는 청색 콜로니를 계수하였다. 효모 및 곰팡이의 측정을 위해 사용한 PYM에서는 핑크에서 녹색의 빛깔을 나타내며 작고 가장자리 부분이 명확히 구분되는 것을 효모균으로 계수하였고, 다양한 색상으로 나타나며 큰 공간을 차지하고 가장자리 부분이 명확히 구분되지 않는 것을 곰팡이균으로 계수하였다.

마. 통계처리

- 본 연구의 실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타냈으며, 각 그룹간의 유의성은 SPSS 통계프로그램 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)의 Duncan의 다중범위 시험법 (Duncan's multiple range test)을 이용하여 95% ($p < 0.05$) 신뢰구간에서 각 유의성을 검증하였다.

6. 주원료의 구성약물의 품질표준화

가. LC-MS/MS를 이용한 구아바 잎 추출물의 11종의 phenolic compounds 분석

- 식물은 산화적인 손상으로부터 자신을 보호하기 위해 다양한 항산화 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 최근에 식물에 존재하는 페놀성 화합물이 항산화, 항암, 항세균, 항알러지, 충치방지, 심장질환예방 및 당뇨병 예방 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 구아바 잎 추출물의 phenolic compound로서 gallic acid, (+)-catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin hydrate, luteolin 7-glucoside, p-coumaric acid, myricetin, quercetin, luteolin 및 kaempferol를 분석한 결과는 Table 43과 같았다. 구아바 잎 추출물에는 (+)-catechin 함량이 가장 높았으며 gallic acid, chlorogenic acid, quercetin 순으로 높았다. Catechin은 항균작용, 혈압강화작용, 혈당강하효과 등의 약리작용이 보고되고 있으며, 이외에 항산화 작용, 혈소판 응집억제, 항암작용 등 다양한 생물학적 활성과 약리학적 효과를 가지는 것으로 보고되었다. 또한 gallic acid의 생리활성 연구로는 항산화 및 항염증, 항돌연변이, 항알러지 등이 많이 보고되고 있다. 또한 식품과학 분야에서는 천연 생물자원으로부터 항산화력이 우수한 물질을 탐색하는 연구가 활발히 행해지고 있으며, 추출된 생리활성소재를 기능성 식품에 첨가하는 식품개발에 대한 연구가 많은 관심을 받고 있다. 이와 같이 본 연구에서 11종의 phenolic compounds를 분석한 결과 구아바 잎에는 다양한 생리활성 물질이 있으며 특히 (+)-catechin과 gallic acid의 함량이 높은 것으로 나타났다 (Table 43).

Table 43. Quantitative analytical results of the guava leaves extract.

Compound	Contents ($\mu\text{g/g}$)
Gallic acid	213.97 \pm 6.24
(+)-Catechin	4456.49 \pm 43.27
Chlorogenic acid	55.86 \pm 2.16
Caffeic acid	4.54 \pm 0.25
Rutin hydrate	0.27 \pm 0.01
Luteolin 7-glucoside	1.91 \pm 0.02
<i>p</i> -Coumaric acid	1.26 \pm 0.09
Myricetin	1.70 \pm 0.01
Quercetin	15.65 \pm 2.98
Luteolin	0.23 \pm 0.02
Kaempferol	0.66 \pm 0.02

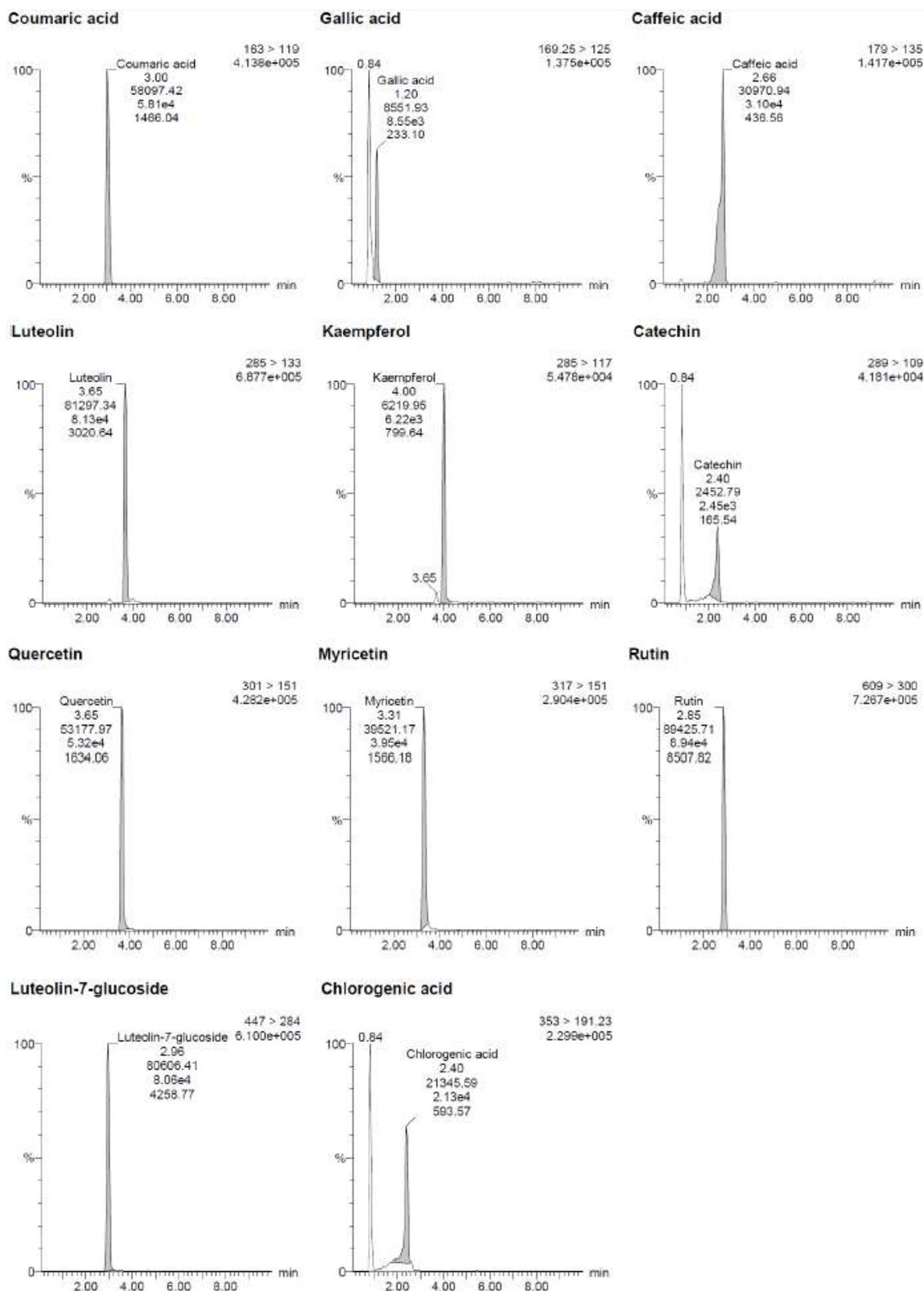


Figure. 138. MRM chromatograms of standard mixture at 1 µg/mL for target compounds analyzed by negative ionization.

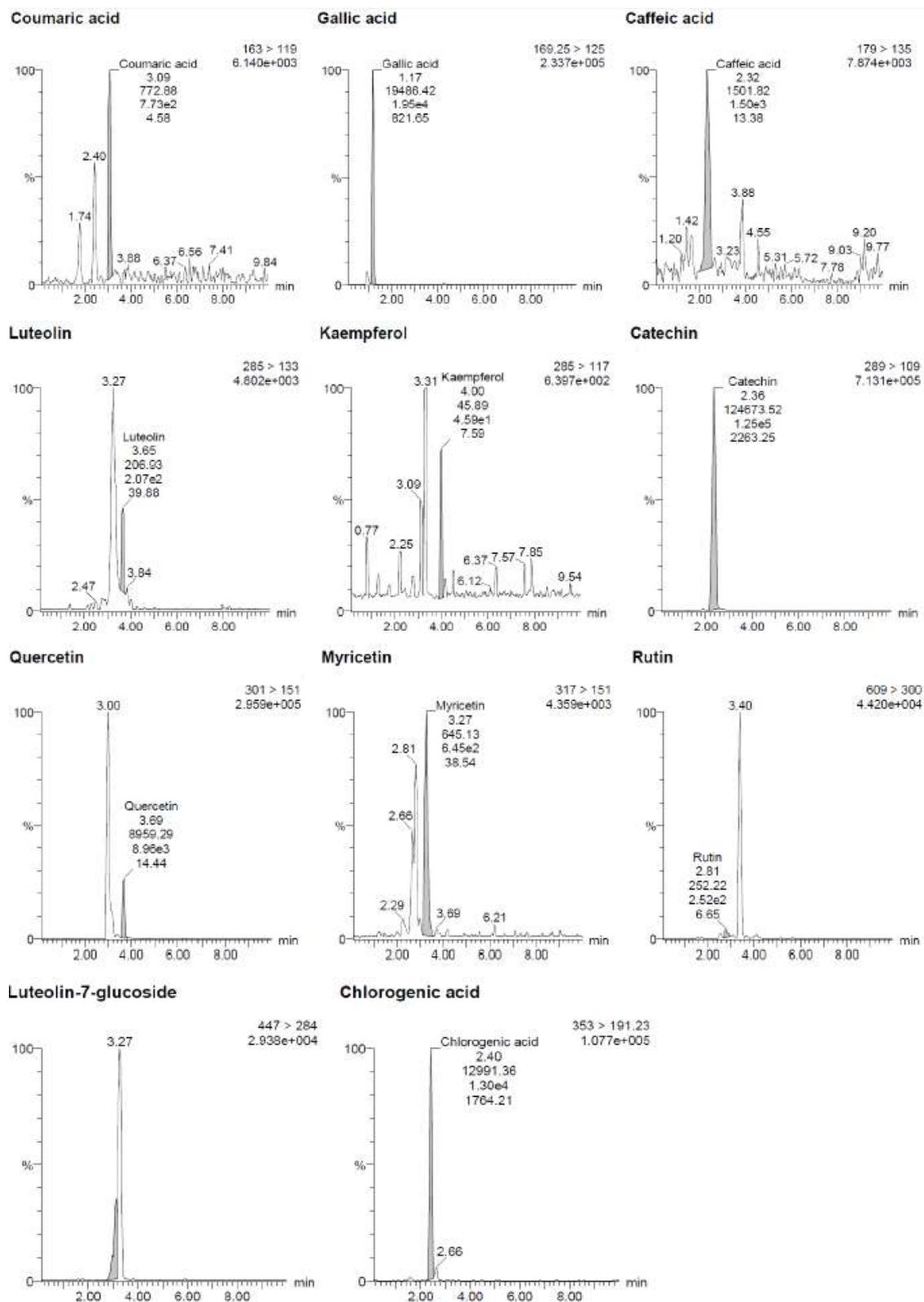


Figure. 139. MRM chromatograms of the guava leaves extract at 1 $\mu\text{g/mL}$ for target compounds analyzed by negative ionization.

나. 정제의 공정 및 특성

(1) 부형제 및 공정 검토

- 정제(tablet)란 분말상의 의약품을 작은 원판모양으로 압축하여 복용하기 쉽게 만든 것이다. 압축정제의 경우 보통 주성분이외에 의약품 첨가제가 함유되는데 부피 부어를 위해 희석제 또는 부형제가 사용되며 점착성 증가 및 과립화 용이를 위해 결합제가 사용된다. 봉해를 촉진하는 봉해제 및 편차와 다이의 마모방지를 위한 활택제도 있다. 주 원료로는 팔삭 과피 초임계 추출물 과 구아바 잎 추출물이며 정제 타정에 사용되는 부형제로는 결정셀룰로오스 및 혼합유당, 히드록시프로필셀룰로오스 등이 있다. 결정셀룰로오스 (cellulose, microcrystalline) 및 유당혼합분말은 부형제 및 약 입자들 간의 결합력을 높여주고 모양을 유지하게 해주는 결합제로서 사용하였다. 히드록시프로필셀룰로오스(hydroxypropylcellulose)는 제조과정에 입자들의 점착성을 높여주어 성분들이 서로 잘 결합할 수 있게 해주는 점도증가제로서 사용하였으며 스테아린산 마그네슘(magnesium stearate)은 활택제로서 이산화규소 (silicon dioxide)는 고결방지제로서 사용하였다. 팔삭과피-구아바 잎 추출물 혼합제제의 정제 (tablet) 1정 (500mg)에 해당하는 배합 비율 (%) 및 배합량 (mg)은 Table 41에 나타내었다. 섭취방법은 경구이며 1일 3정씩 3회 복용하는 것으로 정제 (tablet)의 제조공정도는 Fig. 137과 같다.

(2) 혼합

- 혼합 균질도는 최종제품에서의 함량, 봉해도 부적합, 경도불량 등의 원인이 발생하게 되므로 매우 중요한 공정이다. 사용된 장비로는 하이스피드 믹서와 더블 콘믹서(double cone mixer)가 있는데, 마찰력과 충격이 반복적으로 작용하는 하이스피드 믹서와 비산과 낙차를 이용하는 더블 콘믹서를 이용하여 혼합물의 균질을 일정하게 하였다. 팔삭 과피 초임계 추출물의 경우 기체와 액체의 중간적인 독특한 물성을 가지고 있기 때문에 물에는 녹지 않아 85%주정에 용해하였으며 여기에 셀룰로오스 유도체인 결합제인 히드록시프로필셀룰로오스 (HPC)를 넣어 잘 혼합하였다. 팔삭 과피 결합액과 구아바 혼합물을 균일한 혼합시키기 위해 팔삭 과피 결합액을 노즐을 통해 분사시키는 스프레이 분사를 통해 실시하였다.

(3) 타정

- 타정은 압축력에 의해 가해지는 힘을 이용하여 분체의 기체가 밀려 나가면서 전체적인 부피가 줄어드는 과정이다. 정제의 형태는 예압으로 분체내의 공기를 빼내고 압축시켜 정제의 모양을 형성시키고 본압을 통해 고압에서의 압축과 응집을 통해 완성시켰다. 타정 시 capping, sticking이 일부에서 발생되어 활택제인 스테아린산 마그네슘을 첨가물의 취급 및 적정 제조원가 산출을 위하여 최종적으로 1%를 첨가하여 불량을 최소화 하였다.

(4)코팅

- 본 연구에서는 외관을 미려하게 하고 수분, 산소 등의 대기로부터 내부의 약품을 보호 즉 정제의 표면을 통한 수분이나 가스류의 통과를 저지 및 억제를 위한 피막을 만들어 약의 안정화를 도모하려는 목적으로 코팅을 실시하였다. HPMC는 일반적으로 경구제

제에서 정제 제조 시 결합제나 필름형성제로 가장 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 점도 상승에 의한 스프레이건의 노즐 막힘 현상이나 정제 표면의 성상을 고려하여 1.5% HPMC 코팅을 실시하였으며 실험 작업 조건은 Table 42과 같다. 보통 HPMC는 정제 외부 필름코팅제로 적용될 경우 약 2 % 정도 첨가된다. 또한 낮은 점도의 HPMC는 주로 물을 용매로 한 수계필름코팅에서 사용되고 높은 점도의 HPMC는 유기 용매를 통한 유기필름코팅 적용 시 이용된다. 또한 전형적인 코팅설비에서 코팅용액의 점도가 500 mPa.s.를 초과하게 되면 사용할 수 없게 되므로 전형적인 HPMC 코팅 처방에서는 이 고형분의 함량을 15% 미만으로 사용해야만 한다.

다. 제형 생산시 발생하는 문제점 및 조치방법

- 본 연구에서는 정제를 생산시 발생하는 5가지의 불량 원인을 분석하여 파악 후 조치방법을 설정하였다.

- (1) 중량의 편차 : 다이에 혼합물이 잘 채워지지 않을 경우 발생하므로 팔삭 과피 결합액 및 최종혼합물의 균일한 혼합 여부를 확인하고 타정기의 속도를 조절한다.
- (2) 두께의 편차 : 편치의 길이가 불균일한 경우 발생하므로 편치의 내부 아래쪽부터 편치 헤드의 까지 길이가 ± 0.001 inch이내의 편차를 확인한다.
- (3) 마손도 불량 : 압축력의 약화나 혼합물의 결합력 약화로 발생하므로 압축력의 약화의 경우 예압과 본압의 이상 유무를 확인하고 균형이 잘 맞는지 확인한다. 혼합물의 결합력이 약할 경우 조립공정에서의 문제점을 검토하거나 원료의 물리적 성질에 변화 여부 및 결합제의 선택이 올바른지를 확인한다.
- (4) 캡핑 (capping) : 압축력이 과할 경우 나타나므로 압축력을 조절하고 중량을 줄이거나 두께를 늘린다.
- (5) 봉해불량 : 결합력이 과할 경우 발생하므로 결합제의 양을 조절한다.

라. 정제의 물리적 특성

(1) 정제의 중량편차

- 정제의 중량 균일성을 평가할 목적으로 정제 개개의 중량으로부터 중량편차시험을 사용하여 중량편차를 구한 결과 정제는 $\pm 5\%$ 이내로 나타나 중량편차가 거의 발생하지 않고 동일한 제품으로 제조되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 평균 무게와 개개의 정제의 무게와의 편차가 5%이하로 적합하였다 (Table 44). 제제의 함량균일성은 의약품의 기본요건인 안전성 및 유효성 확보를 위하여 필요하며 따라서 각국 공정서에 따라 이에 대하여 적절히 규제하고 있다. 제제의 함량균일성에 미치는 인자는 정제 등 최종제품에 있어서의 주성분의 분산의 편차와 중량편차라고 할 수 있다. 혼합의 균일성에 미치는 요인으로서 주약과 부형제의 혼합비율, 입자의 크기, 비중, 입자의 형태, 입자표면의 특성, 혼합기의 종류 및 혼합방법 등 여러 가지 물리적 조건 등을 들 수 있다.

(2) 정제의 경도, 두께, 직경 측정

- 정제의 품질기준 및 공정규격을 위해 정제의 무게 (weigh) 및 두께 (thickness), 직경 (diameter), 경도 (hardness)를 측정할 결과는 Table 44과 같았다. 경도는 봉해와 용출

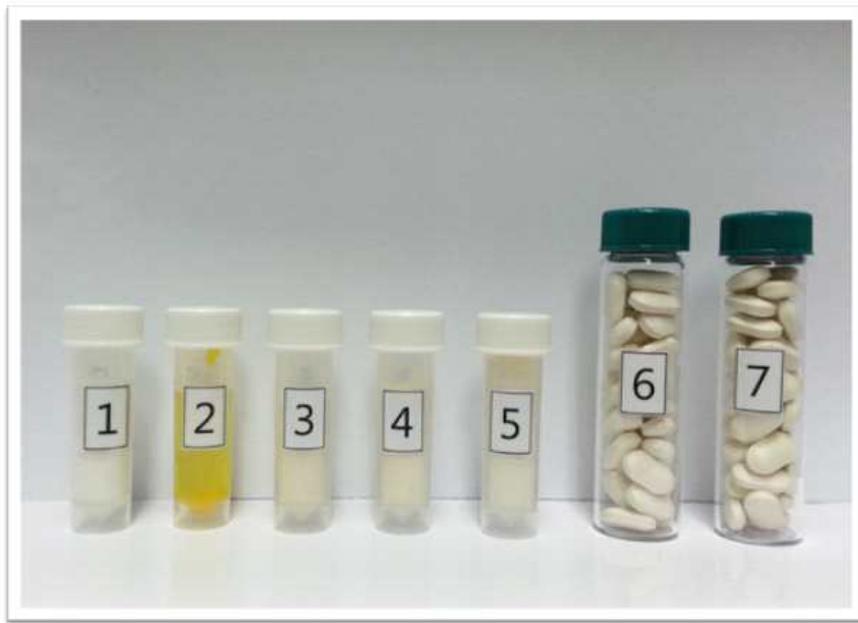
에 영향을 미치므로 압력조절은 매우 중요하다. 정제기의 압력은 3000~4000 lb로 높은 압축압력은 높은 경도를 나타내지만 봉해가 느리며 낮은 압출압력의 경우는 낮은 경도를 나타내지만 봉해가 빠르다. 정제의 제조 공정에서 과립공정의 건조감량 및 타정 공정 중의 설비 트러블에 의해 경도 저하에 따른 마손도가 낮은 제품이 발생할 수 있다.

(3) 마손도 (Friability) 및 봉해도

- 정제의 내구성을 측정하는 것으로 정제의 마손도 (friabilator)와 부서지는 경향 (crumbling)을 측정하게 된다. 나정의 마손도는 정제 표면의 마찰이나 침식에 의해 발생하는 필름 코팅 공정 중에 생기는 문제점 중 가장 일반적인 것이다. 유기용매 코팅의 경우 용매의 휘발을 빨리하고 적용시키는 양을 많이 함으로써 마손되는 속도보다 코팅을 빠르게 하면 된다. 그러나 수계코팅의 경우 정제 표면에 코팅 피막 층이 입혀지는 속도를 증가시키는 것이 용이하지 않기 때문에 나정의 기본 마손도를 최소화하는 것이 가장 중요하다. 마손의 최소화는 정제의 경도를 조정함으로써 어느 정도 해결이 가능하다. 실험에 사용된 나정의 초기 마손도(friability)는 $0.19 \pm 0.01\%$ 이었으며 코팅한 정제의 마손도는 $0.11 \pm 0.01\%$ 로 나정의 상태의 마손도보다 높아진 것을 확인할 수 있었다. 봉해 시간의 경우 25분 02초이었다. 식품공전에 제시된 정제의 봉해 시험은 30분 동안 봉해되는 식품을 적합한 것으로 판정하는데 본 연구에서 제조된 팔삭·구아바 정제는 30분 안에 완전 봉해되어 식품으로서 봉해 시험에 적합한 것으로 판정되었다.

Table 44. Compressed value of uncoated Hassaku-guava tablet.

Test	Average \pm SD
Weight (mg)	493.0 ~ 507.0
Hardness (kp)	6.38 ± 0.48
Thickness (mm)	4.66 ± 0.03
Diameter (mm)	13.82 ± 0.01



Labeling No.	Sample
[1]	STEP 2 (구아바 혼합물)
[2]	STEP 3 (팔삭과피 결합액)
[3]	STEP 5 (구아바+팔삭과피 혼합액, 과립건조 전)
[4]	STEP 7 (구아바+팔삭과피 혼합액, 과립건조 후)
[5]	STEP 10 (구아바+팔삭과피 혼합액, 후 혼합)
[6]	코팅 전 나정
[7]	코팅 후 나정

Figure. 140. 공정별 시료 채취 사진.

7. 공정별 품질관리에 대한 항염증 활성 및 위생안전성

가. 제조 공정별 총 페놀함량 (TPC)

- 총 페놀함량 측정은 항산화 연구에 폭넓게 이용되는 방법이다. 천연에 존재하는 주요한 폴리페놀 화합물은 라디칼 소거능과 강력한 항산화능을 포함한 생리활성을 가지는 것으로 보고되고 있다. 산화적 스트레스를 야기하는 물질인 ROS 및 반응질소물질 (RNS) 등은 여러 가지 대사 및 생화학적 변화를 초래하는 주요원인으로 알려지면서 염증관련 사이토카인의 발현을 향상시켜 염증반응을 더욱 악화시키는 것으로 알려졌다. 또한 생체의 항상성 유지에 필요한 항산화 물질들을 고갈시켜 만성적인 염증질환을 더욱 악화시킨다. 알레르기성 염증질환을 비롯한 각종 인체질환을 치료 또는 개선하기 위해서는 생체의 항산화 기능을 증가시킬 수 있는 물질의 공급이 필요하다. 많은 연구에서 총 페놀함량이 항산화 및 항염증 활성과 상관관계가 있다고 보고된 바 있으며 본 연구에서도 총페놀 함량이 대표적인 염증인자인 NO 및 PGE₂와 상관관계가 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 제조 공정별 항염증 활성에 대한 안정성을 총 페놀함량을 측정하였으며 그 결과 Table 45에 나타낸 바와 같았다. 시료에 대한 총 페놀함량을 측정하기 위해 구아바 혼합물 (STEP 2) 및 삭과피의 결합액 (STEP 3)을 측정한 결과 각각 총 페놀함량 (TPC)은 $291.0 \pm 12.6 \mu\text{g/g}$ 및 $1854.9 \pm 57.9 \mu\text{g/g}$ 이었다. 제조 공정별 TPC의 변화를 측정하기 위해 구아바 혼합물 및 팔삭과피 결합액을 1 : 3 비율로 혼합한 연합물 (STEP 5)의 TPC는 $590.5 \pm 10.4 \mu\text{g/g}$ 이었으며 이를 건조단계 (STEP 7)를 거친 시료의 TPC는 $589.2 \pm 11.7 \mu\text{g/g}$ 으로 건조 전·후에 대한 시료의 TPC에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Table 45). 구아바 및 팔삭과피의 혼합액에 점도 증가 및 물성 향상을 위해 카르복시메틸셀룰로오스칼슘 및 스테아린 마그네슘 분말, 이산화규소분말을 넣고 혼합한 후 혼합 단계 (STEP 10)에서 TPC는 $449.4 \pm 15.8 \mu\text{g/g}$ 으로 이전단계 (STEP 7)인 TPC보다 감소하였다. 이는 후 혼합단계 (STEP 10)에서 카르복시메틸셀룰로오스칼슘 및 스테아린 마그네슘 분말 등의 부형제가 첨가되어 시료 (g)에 대한 TPC이 감소한 것으로 제조 공정상에서의 감소가 아니라 정제 제조를 위한 배합비율에 따른 것으로 나타났다. 타정 단계를 걸쳐 코팅을 하지 않은 나정과 코팅을 한 나정의 TPC는 각각 $440.6 \pm 15.6 \mu\text{g/g}$, $437.9 \pm 9.5 \mu\text{g/g}$ 으로 코팅 전·후에 대한 TPC의 차이 및 후 혼합단계 (STEP 10)에서의 TPC와도 유의적인 차이를 나타나지 않았다. 이는 후 혼합단계에서부터 코팅 전·후 단계까지 제조공정상 시료 (g)에 대한 TPC의 감소는 나타나지 않았다. 제조 공정별 항염증 활성에 대한 안정성을 총 페놀함량을 측정한 결과 제조 공정이 TPC에 영향을 주지 않으며 항염증 활성에 대한 시제품인 타블렛 제조 공정으로서 적합하다고 판단되어졌다.

Table 45. Total phenolic content(TPC) of manufacturing processes for Hassaku-guava tablet.

Type of samples	TPC ¹⁾
Hassaku mixture	291.0 ± 12.6 ^a
Guava mixture	1854.9 ± 57.9 ^b
Kneading	590.5 ± 10.4 ^c
Drying	589.2 ± 11.7 ^c
Mixing	449.4 ± 15.8 ^d
Uncoated tablets	440.6 ± 15.6 ^d
HPMC-coated tablets	437.9 ± 9.5 ^d

¹⁾Results were expressed as µg of gallic acid equivalents (GAEs) per gram of dry weight (µg of GAEs/g of DW).

The different superscript letters within same columns mean significantly different at p<0.05.

All values are mean±SD (n=5).

나. 제조 공정별 미생물학적 오염도 평가

- 식품 중에 존재하는 지표 미생물의 확인시험은 식품의 안전성 평가에 매우 중요하다. 본 연구에서는 정제 제조 시 발생할 수 있는 미생물 오염도를 파악하고자 원료 및 제조 공정별로 채취한 시료에 대한 일반세균수 및 대장균, 대장균군, 효모 및 곰팡이의 미생물 결과는 Table 46에 나타내었다. 각 공정별로 채취한 시료의 사진은 Fig. 140에 나타내었다. 시료는 STEP 2의 구아바 혼합물, STEP 3의 팔삭 과피 결합액을 각각 원료로서 채취하였으며 공정별 연합, 건조, 후 혼합, 코팅 전 나정, 완제품까지 모든 공정별 시료에서 일반세균수, 대장균, 대장균군, 효모 및 곰팡이는 검출되지 않았다. 이는 원료 및 제조 공정에 대한 미생물학적 오염이 나타나지 않았으며 정제 제조 공정에 서 위생상 큰 문제가 될 수 있는 부분은 없는 것으로 사료된다.

Table 46. Microbial contamination levels of manufacturing processes for Hassaku-guava tablet.

Type of samples	Aerobic bacteria	Coliform group	E. coli	Yeast and mold
Hassaku mixture	ND ¹⁾	ND	ND	ND
Guava mixture	ND	ND	ND	ND
Kneading	ND	ND	ND	ND
Drying	ND	ND	ND	ND
Mixing	ND	ND	ND	ND
Uncoated tablets	ND	ND	ND	ND
HPMC-coated tablets	ND	ND	ND	ND

¹⁾Not detected.

All values are Mean log (CFU/g) ± standard deviation (n=3).

8. 천연물 혼합제제를 이용한 시제품 개발

- 아래 그림은 팔삭·구아바 혼합제제를 이용한 혼합정제 시제품(Fig. 141A)과 참여기업에서 생산하고 있는 음료제품의 주원료를 본 연구결과에서 도출한 팔삭·구아바 혼합제제로 대체하여 생산한 팔삭·구아바 혼합음료 “제주예감” 시제품 (Fig. 141B)을 나타내고 있다.



Figure. 141. 시제품 사진. 팔삭·구아바 혼합 정제 (A), 팔삭·구아바 혼합음료 (B).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 평가의 착안점 및 달성도

1. 1차년도 목표달성도

구분 (연도)	주요사업내용	세부연구목표	달성도 (%)	평가의 착안점
1차 년도 (2011)	재래감귤 추출물 및 에센셜 오일의 성분 비교분석 및 세포변이 활성 탐색	▷ 주원료 재래귤의 (사 두감, 당유자, 이에감 등) 다양한 추출물 확 보 및 세포수준에서 세포변이조절 평가	100	○ 재래귤(사두감, 당유자, 이에감) 의 과육, 과피, 통과 부위별 동결건 조 ○ 열수추출물, 주정추출물, 초임계 추출물 제조 ○ MTT assay에 의한 각 추출물의 암세포사멸 효능 비교 ○ GC-MS/MS를 이용한 재래귤 초 임계 추출물의 부위별 생리활성물 질 프로파일링
		▷ 재래감귤 종류별, 부 위별, 추출방법에 따 른 암세포주 세포사 멸 효능 비교	100	○ 암세포주와 정상세포인 fibroblast 에 대한 재래감귤 추출물의 세포 독성 측정 ○ Hoechst 33342 또는 Acridine orange dye 염색 후 현미경으로 세포를 관찰 ○ Flow cytometry analysis에 의해 cell cycle을 측정 ○ 추출물 종류별로 암세포주 특이적인 세포사멸 효능 비교 분석 (autophagy 혹은 apoptosis) 탐색
	표준 제조공정 확립 및 최종제품의 품 질관리 표준설정	▷ 추출조건에 따른 추 출특성 모니터링 및 최적화를 위해 반응 표면분석법(response s u r f a c e methodology, RSM) 을 이용	100	○ 중심합성계획법(central composite design, CCD)에 따라 실험설계 - 독립변수(Xi): 추출온도, 용매농 도, 추출시간 - 종속변수(Yn): 수율, 총폴리페놀 함량, NO 생성량, PGE ₂ 생성량 - 독립변수를 5단계 부호(-1.68, -1, 0, 1, 1.68)화 하여 20구간 에 대한 실험 수행 ○ 최적 추출조건 예측 - NO 및 PGE ₂ 의 각 반응표면을 superimposing 하여 추출 최적조 건 범위 설정

2. 2차 년도 목표달성도

구분 (연도)	주요사업내용	세부연구목표	달성도 (%)	평가의 착안점
2차 년도 (2012)	재래감귤 초임 계 추출물의 암세포변이 조 절 효능 탐색 및 기전 구명	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 재래감귤 미성숙과 종류별 대 사체의 프로파일링 분석을 위한 미성숙과 초임계 추출 물 제조 및 GC/MS분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발된 재래감귤 미성숙과 부위별 (과피, 과육, 통과 등) 열수추출 물, 주정 추출물, 초임계 추출물 제조 ○ 용매추출과 초임계 추출법에 의 한 활성물질 프로파일링 및 추출 조건 최적화 ○ GC-MS/MS를 이용한 미성숙 재래감귤 생리활성물질의 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ▷ 재래감귤 미성숙 초임계 추출 물들에 대한 항암 활성 효능 탐색 ▷ 재래감귤 유래 고활성 천연 물질 우선순위 선정 및 혼합 제제의 세포조절 효능 탐색 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미성숙 재래감귤 (당유자, 이에감, 팔삭) 주정추출물, 초임계 추출 에 대한 MTT assay, Hoechst33342 염색 및 형광현 미경 관찰, FACS analysis에 의 한 암세포사멸 효능 탐색 ○ 초임계 추출물 유래의 항암 후보 물질에 대한 위암세포에서의 항암 활성 효능 탐색 및 western blot 을 통한 기전 탐색
	천연물 혼합제 재를 이용한 제 품 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 산업화 적용을 위한 주원료 (재래감귤)의 최적추출조건 확 립 	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도 주관기관 연구결과, 재 래감귤 중 활성이 가장 우수한 팔 삭 과피를 제공 받아 산업화에 적용하기 위해 추출조건에 따른 추출특성 모니터링 및 최적화 확립 ○ 그 결과, 최적의 추출조건은 추 출온도 30 ~ 45°C(42°C), 에탄올 농도 20 ~ 40%(30%), 추출시간 2 ~ 7시간(4.5시간)으로 확인
		<ul style="list-style-type: none"> ▷ 시제품 제조 및 특성 확인 	90	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항염증 활성이 우수한 음료 개 발을 위한 팔삭, 구아바 및 인 진호의 최적 배합비 확립 ○ 배합비에 따른 제조 특성 확인

3. 3차 년도 목표달성도

구분 (연도)	주요사업내용	세부연구목표	달성도 (%)	평가의 착안점
3차 년도 (2013)	추출물과 활성후보물질들의 세포변이 조절 효능 탐색 및 기전 연구	▷ 2차년도 도출된 천연소재의 세포변이조절 효능 평가 및 기전 구명	100	○ auraptene의 위암세포주에 대한 성장억제 및 세포사멸효능 평가 및 기전 구명 ① Annexin V staining 후 FACS analysis ② Hoechst 염색 및 형광현미경 관찰 ③ FACS 분석에 의한 Cell cycle analysis ④ RT-PCR과 Western blot에 의한 apoptosis 관련 유전자 및 단백질 발현 분석
		▷ 2차년도에 선발된 이예감 초임계추출물 암세포사멸조절 효능 평가 및 기전 구명	100	○ MTT assay를 기초로 추출물 혼합물과 후보물질들에 대한 항암 활성 우선순위 선정 ○ 혼합제제의 항암효능에 대한 시너지 효과 탐색
	활성물질 혼합제제를 이용한 항염증 제품 개발	▷ 산업화 적용을 위한 주원료(재래굴)의 최적추출조건 확립	100	○ 2차년도 선발된 재래감굴과피 초임계 추출물 및 구아바 용매 추출물을 이용한 기타 제형(농축액 또는 tablet 또는 캡슐)에 대한 시제품 개발 ○ LC/MS를 이용한 항염증 활성 물질 프로파일링
		▷ 혼합제제를 이용한 시제품 제조 및 특성 확인	100	○ 고효성 물질을 이용한 혼합제제 구성 ○ 혼합제제별 항염증활성 확인 ○ 부원료 선정 및 적정 원료배합비

제 2절 관련분야의 기여도

1. 기술적 측면

- 저이용 감귤자원인 재래감귤의 고부가가치화 가공기술기반 구축에 기여.
- 재래귤을 이용한 생리활성 성분 분리·정제 기술 확립.
- 재래귤의 대사체 및 생리활성을 비교하여 생리활성에 기여하는 특정 화합물 탐색을 통해 건강기능 식품으로서의 제품가능성 제고
 - 기존의 항암제에 대한 부작용 억제와 상승적 항암효능을 지닌 국내농산물의 활성물질 발굴
 - 우수한 활성을 나타내는 소재개발 및 그 작용기전을 규명함으로써 고부가 가치를 지니는 항암제 및 항암 보조제 개발 가능성 제시
- 재래귤의 기능성규명에 따른 기능성 식품 소재, 화장품소재, 산업소재로의 활용가치 증대

2. 산업적 측면

- 재래귤의 산업적 활용은 온주밀감, 감자 등에 치중하고 있는 제주재배 농작물을 다양화할 수 있으며, 평당 10,000원 내외의 농가소득을 올릴 수 있는 **고소득 작물**로 자리 잡음으로써 제주 경제와 산업에 큰 기여.
- 본 연구개발사업의 수행으로 **재래귤의 수요가 증가**할 것으로 예상되어 **농가소득증대** 및 종자종묘 산업 육성에 기여.
- 재래귤의 기능성 소재로서의 활용가치를 부각시킴으로써, UR 협상결과1997년 이후부터 오렌지 농축주스의 수입이 전면 개방되어 철수 위기에 있는 **제주감귤 가공업체 활성화**에 기여.
- 감귤소득을 증가할 수 있는 고소득 작목으로서 재래귤의 가치를 밝혀냄으로써 **지속가능한 감귤산업**을 기대
- 재래귤유래 phytochemicals로부터 항염증, 세포변이억제 효능 성분의 발굴은 현재 건강기능식품첨가물 수입으로 소비되는 외화낭비를 줄일 수 있으며 국내 **소재산업의 육성**을 유도.
- 국내농산물의 우수성 및 차별성을 입증하여 수입산 대체하고 우리 농산물 수출에 기여
 - 제주 재래귤의 가치를 재조명 평가하여 재래귤의 우수성을 집약한 후 홍보마케팅을 강화함으로써 제주 재래귤의 이미지 제고에 기여.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 실용화 · 산업화 계획

1. 결과물의 활용

- 본 연구는 제주 재래 감귤인 팔삭, 당유자 또는 이에감 추출물, 특히 과피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환에 대한 치료 효과 및 암 예방 또는 치료용 약학조성물 및 암 예방 또는 개선용 식품에 관한 것이다.
- 본 연구에서 목적으로 하는 가장 중요한 핵심 내용은 인체의 다양한 질병과 관련된 염증의 발생을 억제 또는 방지하거나 발생된 염증의 제거와 관련된 천연물 소재를 발굴하는 것이다. 발굴된 천연물 소재는 다양한 용도의 기능성 식품을 대상으로 적용될 수 있으며, 제품의 형태는 크게 2가지(액상 및 고상)로 구분하여 산업화할 예정이다.
- 본 연구에서 계획 중인 최종제품의 특징은 다양한 질병에 대응되는 다양성이 반영된 제품 생산형태를 대상으로 하는 것이다. 이를 위해서는 제품 생산공정을 전통적인 방법(열수추출 및 용매추출)과 최신기법(초임계추출 등)으로 구분하여 이들 각각의 효율 및 경제성을 분석할 예정이다. 즉, 추출되는 천연물 소재 대상 재래귤의 부위 및 기능 활성의 수준 정도에 따라 이들 방법을 적용하는 방식을 다양화하고자 한다.
- 제주 재래 감귤인 팔삭 추출물은 생식용으로 상품성이 낮기 때문에 점차 사라져가고 있는 재래 감귤의 효용성을 의약품 조성물 및 식품가공 소재로서 재조명하여 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 항염용 약학조성물은 천연재료로부터 얻어진 물질로 세포독성이 없으며, 염증 반응 관련 유전자의 발현 억제 효과가 뛰어나, 염증 질환 예방 및 치료를 위한 약학조성물 또는 염증 질환 예방 및 개선을 위한 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.
- 제주 재래 감귤인 팔삭, 당유자 및 이에감에서 부위별, 방법별로 추출된 각 추출물의 처리에서 인간 위암 세포 (human gastric cancer cell)인 AGS 및 인간 자궁경부암 세포 (human cervical cancer cell)인 HeLa 세포의 세포사멸을 확인함으로써, 상기 제주 재래 감귤 추출물의 자궁경부암 또는 위암에 대한 치료 효과 및 다양한 유용성을 밝히고 최종적인 제품의 형태는 기능활성, 안정성이 가장 우선적으로 고려될 예정이며, 저장중의 기능활성 유지와 더불어 위생안전성을 확인하고자 한다.
- 상기 추출물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있으며 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

2. 산업체 이전 및 실용화:

- 본 연구수행을 통해 재래감귤 유래의 천연 기능성 소재의 anti-inflammation 및 세포

변이조절 연구 방향으로 추진하여 2건의 특허와, 항염증활성 증진을 위한 부원료인 구아바와 인진쑥의 추출방법과 관련해서 2건을 특허를 출원함. 사업 종료 후에도 국내 우선권 주장을 위한 추가 실험을 수행하여 국외에 출원할 계획임.

- 성과물은 개발 즉시 특허를 출원하여 독점적인 지적재산권을 확보하며, 참여업체에 이전하여 참여기업이 최종년도 이후에도 직접 제품개발에 참여하여 제품을 생산하며 상품화한다.

3. 현장보급방안:

- 재래굴 재배농가와 계약재배를 통해 다량으로 원료를 확보할 수 있는 계획을 수립하며, 선정된 농산물의 시장 확보를 유기적으로 관계를 유지함으로써 농가에 안정적인 수입원을 제공한다.
- 팔삭의 수확시기는 12월에서 1월이고, 출하시기는 2월에서 3월사이에 이루어진다. 팔삭의 특징 중 하나는 다른 일반 감귤의 크기보다 2.5배 정도 크다는 점이다. 또한 내한성, 내충성이 다른 개량종보다 강하여 재배시 관리가 수월하다. 또한 많은 농가가 재배하고 있지 않기 때문에 희소성이 인정되며, 시제품이 출시 될 경우, 팔삭 재배농가와 직접적인 계약을 통해 일정량의 팔삭 과육을 매년 공급할 수 있을 것으로 예상된다.

제 2절 추가연구개발

1. 논문투고 계획

- 본 연구에서 지향하는 방향과 관련하여 재래감귤류의 anti-inflammation 및 세포변이조절과 관련하여 검색되는 논문은 없으며, 재래감귤류의 다른 농산물의 경우는 anti-inflammation관련 11건, 세포변이조절관련 39건이 확인되었음.
- 재래감귤류 유래의 천연 기능성 소재의 anti-inflammation 및 세포변이조절 연구 방향으로 성공적 연구를 추진하여 재래굴 초임계 추출물의 성분 에 대한 SCI급 논문 7편과 비SCI급 1편이 발표되었으며, SCI급 1편이 게재할 확정되었음.
- 최종년도에는 재래감귤 추출물의 항염증활성에 대한 동물실험과 재래감귤 유래의 활성 물질의 세포변이활성 및 기전에 대한 연구를 추가수행함으로써 SCI급 논문 2편 이상을 투고할 예정임.

2. 추가기술개발:

- 본 연구를 통해 *in vitro* 효능에 관련된 기초 결과는 매우 안정적으로 확보되었으나, 기능성 식품 신소재 개발을 위해서 동물 및 인체 실험 연구가 추가적으로 진행된다면 기능성식품의 상품화가 용이할 것으로 사료되며 이는 농민 소득 증대로 이어질 것으로 판단됨.
- 본 과제 종료 후의 추가기술은 참여기업의 기술료로 충당하며, 지속적인 기술개발 완료를 위해 본 과제의 시제품으로 형성되는 매출의 일정부분을 연구개발에 투자할 예정임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내의 기능성 식품 시장규모는 매우 높은 성장을 이룰 것으로 예상되며 일반적으로 2015년에는 약 10조원대의 시장규모를 보일 것으로 전망되고 있으며, 특히 항암특성 및 면역기능특성에 대한 제품들의 성장세가 두드러질 것으로 예상되고 있다 [11].
- 최근 질병을 예방 혹은 치료할 수 있는 기능은 식품이나 식물체도 가지고 있다는 것이 보고되고 있으며, 보다 건강하게 오래 살고자 하는 인류의 필요에 따라 근래에 이르러 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 다양한 자원으로부터 다양한 생리기능을 가진 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 그 중에서도 특히 식물자원에 포함된 화합물에 많은 관심이 집중되고 있다 [12,13].
- 대표적인 phytochemicals중인 flavonoid에 대한 국내 연구동향은, flavonoid 화합물의 추출, 분리, 구조 규명에 관한 연구(14,15), flavonoid 화합물의 효능 규명에 관한 연구(16,17), 항산화효능에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.
- 그동안 식물에서 얻어진 물질이 NF- κ B 신호 경로의 억제를 통한 항염증 효과에 영향을 미친다는 것을 확인하였으나 [18,19] 본 발명에서와 같이, 제주 재래 감귤인 팔삭의 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대해서는 개시된 바가 전혀 없는 것으로 조사되었다.
- 항염증 및 세포변이조절 기능의 기능성 식품에 대한 별도의 제품의 통계자료가 제시된 것은 없었으나, 최근에 항염증 기능이 매우 다양한 질환들과 관련이 있는 것으로 확인되어 보고되고 있어, 본 연구에서 지향하는 제품의 시장 규모는 그동안 알려진 일반적인 건강기능식품의 수준을 훨씬 초과할 것으로 전망된다. 따라서, 본 연구의 핵심적 기능 특성인 재래감귤을 비롯한 기타 천연소재들의 세포변이활성 및 항염증 기능 특성을 응용하여 다양한 질환에 대응하는 제품을 생산할 경우 그 파급 효과는 매우 클 것으로 예상된다.

제 2절 국외 제품생산 및 시장 현황

- 의약품에 의존하기 보다는 사전에 대비적으로 건강과 웰빙에 관심을 갖고자하는 소비자들의 욕구가 지속적으로 증대되고 있는 것을 감안하면 이들 기능성 식품의 시장 규모는 더욱 가속적으로 성장할 수도 있을 것으로 전망된다.
- 세계 기능성 식품 시장은 2010년~2013년에 약 1,600억~1,800억 달러에 이를 것으로 전망되고 있으며 [20], 질병의 치료보다는 예방이 더욱 중요하다는 인식이 확대되고 있다.
- 최근 세계 각국의 연구 프로젝트에서 감귤류는 여러 가지 기능을 가진 식물성분이 포함되어 있는 기능성성분의 보물창고로 알려져 있어 [21,22] 감귤류의 부위별 다양한 추출방법과 또다른 식물 추출물의 혼합으로 flavonoid의 함량을 상승시켜 다양한 건강보조제를 개발한다면 그 파급효과는 굉장할 것으로 예상된다.
- 특히 flavonoid류의 기능성 성분이 많은 것으로 알려져 있는데, 이러한 flavonoid류는 항염증 작용 이외에도 항암, 항산화등 다양한 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며 이러

한 flavonoid를 활용한 기능성 식품도 다양하게 개발되고 있음 [23,24].

○ 본 연구에서 목표로 하는 최종 제품 및 연구결과의 성공적 수행은 다양한 질병의 예방과 치료의 양쪽 측면에서 모두 사용할 수 있는 바, 매우 광범위한 용도의 다양한 형태 제품에 적용이 가능할 것으로 예상된다.

제 3절 파이토케미컬 유래 항암소재 개발 현황

- 기존의 항암제는 DNA 알킬화를 일으키는 Meclorothamine, Busulfan 대사길항효과의 methotrexate Fluorouracil 또는 천연물 유래 Taxol등 과 호르몬제들이 그 주를 이루고 이들은 암세포의 선택적인 사멸 유도를 주요 목표로 하고 있다. 그러나 이들은 정상세포에의 독성과 암세포의 분화유도 및 전이 유도등의 부작용을 내포하고 있어 새로운 기전의 항암제 개발이 요망되고 있음.
- 식이 가능한 phytochemical의 생리활성 기작에 대해 여러 가지 연구 사례가 보고되고 있지만, 정확한 분자생물학적인 기작 규명을 위해서는 적용 가능한 섭취량, 장시간 처리 시의 효능, 3차원적 세포 배양조건, 다양한 종류의 cancer subtypes 세포의 사용, 유사한 구조를 지닌 다양한 종류의 플라보노이드 유도체 화합물들과 기존에 상용되고 있는 항암제들과의 조합에 따른 세포사멸 효능을 비교분석하고 특이적인 분자 및 세포적 타겟의 동정에 의한 각 화합물의 항암기작 연구가 필요함.
- 이러한 *in vitro* 연구의 단점을 최소화하기 위해서는 암세포에 비교적 짧은 시간 처리 시 효능을 보여주는 농도에 대해서 정상세포에는 독성을 나타내지 않고 오로지 암세포에 대해서만 사멸 효능을 나타내는 농도와 관련해서 기전연구가 수행되어야 함.
- 대표적인 phytochemicals종인 플라보노이드에 대한 국내 연구동향은, flavonoid 화합물의 추출, 분리, 구조 규명에 관한 연구(15,25), flavonoid 화합물의 효능 규명에 관한 연구[16,26], 항산화효능에 대한 연구가 매우 활발히 진행되어 왔으며,
- 국외 연구동향은 암세포사멸이나 증식억제효능을 유발하는 신호전달에 미치는 파이토케미칼의 영향에 대해 집중적인 노력을 하고 있으며, 대표적인 phytochemicals인 일부 플라보노이드에 의한 세포내 신호전달경로에는 MAPK 경로, AKT 경로와 세포주기진행에 관여하는 단백질들인 것으로 보고되고 있음 [27].
- 이와 같이 일부 플라보노이드 화합물의 인간 암세포주에서와 *in vivo* 실험에서의 항암활성과 그 기작에 대해 많은 부분이 규명되어 새로운 암치료제로서의 기대를 보이고 있으나 [28], 전반적으로 파이토케미칼에 대한 기전 연구는 초기 단계에 있으므로 다양한 농산물 유래 파이토케미칼들을 대상으로 항암활성 기전 연구와 더불어 구조-활성 상관관계 (quantitatively structure-activity relationships, QSAR) 연구가 필요함.

제 7 장. 참고문헌

- 1) Han SC, Kang HK, Yoo ES, Yi EJ, Kang GJ. The Inhibitory Effect of Premature Citrus unshiu Extract on Atopic Dermatitis In Vitro and In Vivo, *Toxicol Res*, 27(3),173-180 (2011)
- 2) 한상미, 우순옥, 남성희, 박서희. 제주산 감귤꿀과 유채꿀의 항산화 및 멜라닌 생성 억제 효과, *한국양봉학회*, 26(2), 129-134 (2011)
- 3) 송은영, 최영훈, 강경희, 고정삼. 제주산 감귤류의 숙기에 따른 유리당, 유기산, 헤스페리딘, 나린진, 무기물 함량의 변화, *Korean J. Food Sci. Technol*, 30(2), 306-312 (1998)
- 4) 류미라, 김은영, 배인영, 박용곤. 제주재래종 감귤류 미숙과의 neohesperidin, naringin 및 hesperidin 함량, *Korean J. Food Sci. Technol*, 34(1), 132-135 (2002)
- 5) Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF- κ B, *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 42(4), 519-523 (2010)
- 6) Beg AA, Baltimore D. An Essential Roles for NF- κ B in Preventing TNF- α -Induced Cell Death. *Science*, 274(6), 782-784 (1996)
- 7) Cragg MS, Harris C, Strasser A, Scott CL. Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nat Rev Cancer* 9, 321-326 (2009).
- 8) Pavet V, Portal MM, Moulin JC, Herbrecht R, Gronemeyer H. Towards novel paradigms for cancer therapy. *Oncogene* 30, 1-20 (2011).
- 9) Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, Zacharou A, Lopez J, MacFarlane M, Cain K, Meier P. The ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell* 43, 432-448 (2011).
- 10) Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, Bause A, Li Y, Stommel JM, Dell'antonio G, Mautner J, Tonon G, Haiqis M, Shirihai OS, Doglioni C, Bardeesy N, Kimmelman AC. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 25, 717-729 (2011).
- 11) 남윤인순의원실. 기능성식품산업의 실태와 정책과제, 고려대학교 건강기능식품연구센터 주최, (2012)
- 12) Na GM, Han HS, Ye SH, Kim HJ. Physiological Activity of Medicinal Plant Extracts, *Korean J. Medcinal Crop Sci*, 11(3), 388-393 (2003)
- 13) Lee, SE *et al.*, Inhibitory Activity on Angiotensin Converting Enzyme (ACE) of Korean Medicinal Herbs, *Korean J. Medcinal Crop Sci*. 12(1), 73-78 (2004)
- 14) Yong Y, Shin SY, Lee Y, Kim SH, Lee YH, Lim Y. A compound isolated from *Rumex japonicus* induces apoptosis in HeLa cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 53, 567-660 (2010).
- 15) Shin SY, Yong Y, Kim CG, Lee YH, Lim Y. Deoxypodophyllotoxin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HeLa cells. *Cancer Lett* 287, 231-239 (2009).
- 16) Yong Y, Shin SY, Lee YH, Lim Y. Antitumor activity of deoxypodophyllotoxin isolated from *Anthriscus sylvestris*: Induction of G2/M cell cycle arrest and

caspase-dependent apoptosis. *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 4367–4371 (2009).

- 17) Lee JH, Lee BH, Choi SH, Yoon IS, Pyo MK, Shin, TJ et al. Ginsenoside Rg3 inhibits human Kv1.4 channel currents by interacting with the K531 residue. *Mol Pharmacol*, 73, 619–626 (2008).
- 18) Paur I *et al.*. Extract of oregano, coffee, thyme, clove, and walnuts inhibits NF- κ B in monocytes and in transgenic reporter mice, *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(5), 653–663 (2010)
- 19) Madhusoodhanan R *et al.*. Effect of black raspberry extract in inhibiting NF κ B dependent radioprotection in human breast cancer cells, *Nutr Cancer*. 62(1), 93–104 (2010)
- 20) Global Market Review of Functional Foods–2010 Forecasts & 2013 Forecasts, AROQ Limited
- 21) Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid composition of Citrus Juices, *Molecules* 12, 1641–1673 (2007)
- 22) Kang HJ, Chawla SP, Kwon JH, Byun MW. Studies on the development of functional powder from citrus peel, *Bioresour Technol* 97(4), 614–620 2006.
- 23) Engler MB et al., Flavonoide-rich Dark Chocolate Improvs Endothelial Function and Increases Plasma Epicatechin Concentrations in Healthy Adults. *J Am Coll Nutr* 23(3), 197–204 2004.
- 24) Chan FL, Choi HL, Chan PSF, Huang Y. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin, *Cancer letters* 160(2), 219–228 2000.
- 25) Yong, Y. Shin, SY. Lee, Y, Kim, SH. Lee, YH. Lim, Y. A compound isolated from *Rumex japonicus* induces apoptosis in HeLa cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 53, 567–660 (2010).
- 26) Lee, JH. Lee, BH. Choi, SH. Yoon, IS. Pyo, MK. Shin, TJ. Choi, WS. Lim, Y. Rhim, H. Won, KH. Lim, YW. Choe, H. Kim, DH. Kim, YI. Nah, SY. Ginsenoside Rg3 inhibits human Kv1.4 channel currents by interacting with the K531 residue. *Mol Pharmacol* 73, 619–626 (2008).
- 27) Lee KW, Bode AM and Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 11, 211–218 (2011).
- 28) Li-Weber, M. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat Rev* 35, 57–68 (2009).

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.