최 종
연 구 보 고 서

녹차 추출물을 이용한 항염증 연고제 개발의 기반연구

Development of antiinflammatory ointment using green tea extract

연구기관
전남대학교 약학대학

농 림 부

편집순서 2

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “녹차 추출물을 이용한 항염증 연고제 개발의 기반연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 전남대학교
총괄연구책임자 : 최 현 진
세부연구책임자 : 최 중 갑
세부연구책임자 : 이 익 수
연 구 원 : 총 유 도
연 구 원 : 황 선 영
연 구 원 : 김 소 현
연 구 원 : 강 민 아
연 구 원 : 김 영 준
연 구 원 : 임 주 희

편집순서 3

요 약 문

Ⅰ. 제 목

녹차 추출물을 이용한 항염증 연고제 개발의 기반연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제의 연구목표는 현재 '보성녹차영농조합법인'에서 제조, 판매되고 있는 '녹차추출농축액'을 이용하여 항염증 효과를 가지는 연고제로의 개발 가능성을 검토하고자 하는 것으로, 녹차추출물로부터 항염 활성성분 추출 및 분획의 적정조건을 확립하여 항염활성 성분 함유 분획을 추출하여 각 분획의 항염 효과를 중심으로 한 생리활성을 평가하고 그 기전 규명을 통하여 약리학적 효능을 검증하고자 한다. 또한 유효 항염증 활성 물질의 정량법 확립을 통하여 향후 품질관리에 적용할 수 있는 시험방법을 설정함으로서 상품의 표준화 및 항염증 성분의 추적을 연구개발의 목표로 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1) 녹차추출물의 항염증 활성 물질의 정량법 확립 및 함량 분석
- 보성녹차추출물의 항염증 분석에 적당한 분석법을 개발하여 추출물중 항염증 성분의 추적에 이용
- 항염증 지표 물질에 대한 정량성을 확립함으로써 기준 및 시험방법 설정과 quality control을 통한 녹차 상품 표준화에 이용

2) 녹차추출물 유래의 항염증 활성 성분 분리
- 각종 용매를 이용하여 보성녹차추출물로부터 녹차 표준엑스 제조
- 항염증 및 항산화 활성이 인정되는 녹차 표준엑스로부터 생리활성 분획 제조
- 생리활성 분획으로부터 생리활성 소분획 제조

- 활성 소분획으로부터 항염증 항산화 성분 분리 및 정제
- 분리된 활성 성분의 화학구조 규명

3) 녹차추출물의 항염증 관련 생리활성의 약리학적 검증
- 보성녹차추출물의 항염활성 검증 및 함유 성분이 면역세포 활성화와 관련 신호전달기전에 미치는 영향 평가를 통한 항염증 효과 검토
- 항산화 활성 평가를 통한 염증반응에서의 세포보호 효과 연구
- 피부 구성 주된 세포인 keratinocyte에 대한 독성시험을 통해 연고제로의 개발시 피부독성 유발 가능성 평가

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 이미 상품화된 녹차추출물의 유효성분 함량을 정량화/표준화함으로써 상품의 균질성을 확보
- 유효 생리활성 물질의 함량 분석 규명으로, 가공제품들의 효능에 대한 과학적인 근거 제공
- 향후 개발되는 각종 녹차 제품들의 건강 기능성식품 품목허가 신청시 필수적으로 요구되는 함량 표시 및 효능 표시의 근거자료로 활용
- 녹차추출물의 항염증 효과 검증을 통한 항염증 연고제 개발의 기초자료 제공, 연고제의 상품화 연구로 연계

편집순서 4

SUMMARY
(영문요약문)

Ⅰ. Title of the Research

Development of antiinflammatory ointment using green tea extract

Ⅱ. Specific Aims and Significance of the Research

Objective of this research project is to broaden the scope of GTE (green tea extract) application and to investigate the possibility of developing antiinflammatory ointments using 'Green Tea Concentrate (GTC)' (manufactured and marketed by 'Bosung Green Tea Agricultural Cooperative, Inc.'). Specific aims of the research are as follows:

1) Establishment of analytical method for effective anti-inflammatory compounds of green tea extract and standardization of green tea products
2) Isolation of antiinflammatory constituents and establishment of optimal conditions for extraction and fractionation of GTC
3) Evaluation of biological activities with special emphasis on the antiinflammatory activity, and validation of pharmacological efficacy through mechanistic studies

Ⅲ. Content and Scope of the Research

1) Establishment of analytical method for effective anti-inflammatory compounds of green tea extracts and products.
- Establishment of analytical method for effective anti-inflammatory compounds of green tea and use for a quality control of green tea products

- Find effective anti-inflammatory compounds of green tea as marker compounds to establish an analytical method and to standardize green tea products.

2) Isolation of antiinflammatory constituents from green tea extract
- Preparation of green tea standard extracts from Bosung Green Tea Concentrate
- Fractionation of green tea standard extracts with proven anti-inflammatory and antioxidative activity
- Subfractionation of bioactive fractions
- Isolation and purification of antiinflammatory and antioxidative compounds from active subfractions
- Structure elucidation of active isolates

3) Pharmacological evaluation of antiinflammatory effect of green tea extract
- Evaluation of antiinflammatory effect of Bosung Green Tea Concentrate and isolated compounds: Effects on LPS-induced inflammatory response in Raw 264.7 cells and related signal transduction
- Evaluation of cytoprotective effect of antiinflammatory compounds of Bosung Green Tea Concentrate against oxidative stress
- Evaluation of cytotoxicity on keratinocyte

Ⅳ. Results of the Research and Suggestions on Their Application

- Efficient quality control of the GTC-derived products, which are currently on the market, is ensured by developing quantitative determination and standardization methods for the active ingredients of GTC.
- Scientific advice on the enhanced biological activity profile of the GTE-derived products is made possible by providing quantitative determination data for the contents of biologically active compounds.
- Research results can be used as supportive data for the specification of contents and efficacy of active ingredients, which is required for the application of various GTC-derived functional food products to be licensed for manufacture by KFDA.
- Research results can provide preliminary activity profile data of the GTC ingredients for use in the development of antiinflammatory ointment via validation of the antiinflammatory activity of GTC, which will eventually lead to the commercialization of the ointment.

편집순서 5

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction: Overview of the Research Project ---------- 10

Section 1. Significance and Necessity of the Research ---------- 10

Section 2. Objectives of the Research ---------- 11

Section 3. Scope of the Research ---------- 12

1. Establishment of analytical method for effective antiinflammatory compounds of green tea extract and standardization of green tea products ---------- 12

2. Isolation of antiinflammatory constituents from green tea extract ---------- 12

3. Evaluation of biological activities with special emphasis on the antiinflammatory activity, and validation of pharmacological efficacy through mechanistic studies ------ 13

Chapter 2. Present Status of the Research at Home and Abroad ----- 14

Section 1. Present Status of the Research Development in the Related Fields inside and outside the Country ---------- 14

1. Present status of the research development in the related fields inside the country ------- 14

2. Present status of the research development in the related fields outside the country ------- 14

Section 2. Impact of the Research Results on the Present Status of Research Development in and outside the Country ---------- 15

Chapter 3. Contents and Results of the Research ---------- 20

Section 1. Research Design and Methods ---------- 20

1. Green tea extracts ---------- 20

2. The 1st Sub-project: Establishment of analytical method for effective antiinflammatory compounds of green tea extract and standardization of green tea products ---------- 20

3. The 2nd Sub-project: Isolation of antiinflammatory constituents from green tea extract

---------- 21

4. The 3rd Sub-project: Evaluation of biological activities with special emphasis on the antiinflammatory activity, and validation of pharmacological efficacy through mechanistic studies ---------- 23

Section 2. Contents and Results of the Research ---------- 25

1. Establishment of analytical method for effective antiinflammatory compounds of green tea extracts ---------- 25

2. Determination of the bioactive compounds in the Green Tea Concentrate ---------- 27

3. Method development for the decaffeination of Green Tea Concentrate ---------- 27

4. Isolation of the antiinflammatory constituents from green tea (*Camellia sinensis*) by extraction and fractionation ---------- 33

5. Structure elucidation of the antiinflammatory constituents ---------- 40

6. Evaluation of the antiinflammatory activity of the GTC fractions ---------- 51

7. Identification of the drug targets related to the antiinflammatory effect of GTC and isolated compounds ---------- 56

8. Evaluation of cytoprotective effect of the antiinflammatory compounds of GTC against oxidative stress ---------- 57

9. Evaluation of cytotoxicity on keratinocytes ---------- 58

10. Determination of the antiinflammatory constituents of the GTC fractions ----------59

Chaper 4. Objectives Attained and Level of Contribution in the Relevant Fields ---------- 72

1. Objectives Attained ---------- 72

2. Level of Contribution in the Relevant Fields ---------- 75

Chapter 5. Practical Application Plans for the Research Results ------ 76

1. Necessity for Extended Research ---------- 76

2. Application to Other Research Areas ---------- 76

3. Technology Commercialization ---------- 76

Chapter 6. References ---------- 77

편집순서 6

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요---------- 10

제 1 절. 연구개발의 중요성 및 필요성---------- 10

제 2 절. 연구개발의 목적---------- 11

제 3 절. 연구개발의 범위---------- 12

1) 녹차추출물의 유효 항염증 활성 물질의 정량법 확립을 통한 시험방법 설정과 상품의 표준화 및 항염증 성분의 추적---------- 12

2) 녹차추출물 유래의 항염증 활성 성분 분리---------- 12

3) 항염증 관련 생리활성의 평가와 기전 규명을 통한 약리학적 검증---------- 13

제 2 장 국내외 기술개발 현황----------14

제 1 절. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황---------- 14

1) 관련분야의 국외 연구개발 현황---------- 14

2) 관련분야의 국내 연구개발 현황---------- 14

제 2 절. 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치---------- 15

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과---------- 20

제 1 절. 연구개발의 접근방법---------- 20

1) 녹차추출물---------- 20

2) 제 1 세부과제: 녹차추출물의 유효 항염증 생리활성 물질의 정량법 확립을 통한 시험방법 설정과 상품 표준화 및 항염증 생리활성 물질의 추적----------20

3) 제 2 세부과제: 녹차추출물 유래의 항염증 활성 성분 분리---------- 21

4) 제 3 세부과제: 항염증 효과를 중심으로 한 생리활성의 평가 및 기전 규명을 통한 약리학적 효능 검증---------- 23

제 2 절. 연구내용 및 결과---------- 25

1. 녹차의 항염증 생리활성 성분의 분석법 확립---------- 25

2. 녹차농축액의 생리활성 성분 정량---------- 27

3. 녹차추출농축액으로부터의 caffeine 제거방법 확립---------- 27

4. 추출 및 분획을 통한 녹차(*Camellia sinensis*)에서의 항염 활성물질 분리---------- 33

5. 항염활성 성분의 화학구조의 결정---------- 40
6. 녹차농축액 분획추출물의 항염 활성 평가---------- 51
7. 녹차추출물의 항염증 효과와 관련된 세포 내 약물작용 타겟 확인---------- 56
8. 녹차추출물의 항산화 활성 평가를 통한 염증반응에서의 세포보호 효과---------- 57
9. 피부 구성 세포에 대한 녹차추출물의 세포독성 여부 평가---------- 58
10. 녹차농축액 추출분획 중의 항염 활성 성분 함유량 정량---------- 59

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도---------- 72

가. 목표달성도---------- 72
나. 관련분야 기여도---------- 75

제 5 장 연구개발결과의 활용계획---------- 76

가. 추가연구의 필요성---------- 76
나. 타 연구에의 응용---------- 76
다. 기업화 추진 방안---------- 76

제 6 장 참고문헌---------- 77

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 중요성 및 필요성

녹차 (green tea)는 5천여 년의 긴 역사를 가진 기호음료이자 건강음료이다. 과거로부터 경험적으로 알려진 여러 효능으로 인해 다양한 질병의 치료약으로 사용되어 왔고 최근 우리 전통차가 가지고 있는 기능들의 과학적 근거들이 밝혀지면서 재배와 소비가 매년 늘어나고 있다. 뿐만 아니라 **재배 및 제조의 신기술 개발과 새로운 효능의 입증 등으로 그 응용이 점차 다양**해지고 있다.

보성의 녹차 추출물 ('보성녹차농축 앰플', 보성녹차영농조합법인)은 상품으로서의 가치가 상당히 입증되어 있는 아이디어 상품으로 현재 주류의 첨가물 등으로 애용되고 있다. 그러나 현재의 상품 가치와 미래의 새로의 상품을 개발하기 위해서는 **녹차 추출물의 새로운 가치 창조가 필요**한 시점이다. 녹차의 성분은 차나무 재배의 자연조건과 찻잎 따는 시기, 제다법, 보관상태 등에 따라 차이가 나는데, 풍미와 생리활성과 관련되는 주성분으로 폴리페놀(polyphenol)류인 카테킨(catechin)이 많이 알려져 있다. 카테킨 이외에 카페인, 플라보노이드, 차의 맛과 관련되는 유리아미노산, 글루타민산(glutamic acid), 아스파라긴산(aspartic acid), 알기닌(arginine) 등 필수아미노산이 함유되어 있다. 또한 비타민 C, E, 카로틴 등의 비타민류와 불소, 아연, 셀레늄 등의 무기물질들을 함유하고 있다. 이러한 녹차 함유 성분들 중, **주요 유효성분에 대한 표준화 작업과 이들 성분의 새로운 영역에서의 유용성을 확인한다면 현재의 부가가치를 현저히 능가할 수 있는 신상품 개발이 가능**하다. **현 녹차 추출물의 표준화를 위해서는 유효 지표 물질의 선택이 우선되어야 하며 이의 정량법을 확립함으로써 상품의 quality control이 가능**하다. 이는 균질한 녹차 추출물 상품 생산의 기본 요건으로써 소비자의 신뢰도를 높일 수 있을 것이다. 또한 녹차 추출물의 상품 다양성을 확보하기위해서는 새로운 상품 적응성을 개발하여야 한다. 최근 녹차 추출물의 유용성이 더욱 부각되고 있는 시점에서 보성의 녹차도 그 우수성을 과학적으로 검증하여 부가가치 창조에 참여하여야 할 것이다.

녹차의 대표적인 생리효능으로는, 항암, 노화억제, 고혈압 및 동맥경화 예방, 체질개선, 당뇨병 억제, 중금속 등의 해독, 비만방지, 및 다양한 살균효과 등이 알려져 있으며, 이 외에도 충치예방과 구취제거효과, 피부미용효과, 피로회복효과, 변비치료효과, 천식예방 등 그 효용성이 무궁무진한 건강식품임이 입증되고 있다. 이와 같은 **녹차의 다양한 효능이 제시되고 있음에도 불구하고 과학적 기전에 근거하여 질병의 치료에 적용할 수 있는 고부가가치 상품으로의 개발은 매**

우 미흡하다. 따라서 **녹차의 다양한 생리활성 성분에 대한 정확한 분석과 이를 근거로 한 생리활성과의 상관관계 규명, 약물학적 타깃이 되는 유효성분의 효과적인 추출법의 확립 등에 대한 총체적인 연구가 우선적으로 필요한 실정**이다.

제 2 절. 연구개발의 목적

환경오염과 잘못된 식생활 등 환경의 영향으로 피부질환 환자들이 급격히 증가하고 있다. 피부질환을 유발하게 되는 직접적인 원인이나 관련 균 등은 매우 다양하지만 기본적으로 염증과 가려움증과 같은 공통의 증상을 동반하게 된다. 이러한 증상의 치료, 완화는 염증을 유발하게 되는 원인에 대한 치료와 함께 전반적인 염증 치료에 매우 중요한 역할을 한다. 염증 치료에 적용되는 다양한 연고제의 주성분 중 하나로 “스테로이드”가 쓰이는데, 스테로이드는 염증의 증상 개선에 매우 효과적이기는 하나 면역체계나 피부 기능에 대한 이상을 초래하거나 사용 중단시 반사적으로 증상이 악화될 수 있는 등, 부작용 또한 큰 약물이다. 따라서 **부작용을 최소화하면서 염증성 질환의 치료에 적용할 수 있는 유효성분이 발굴이 필요**하다. 녹차가 이질균, 장티푸스균, 포도상구균 등의 세균의 성장을 억제하는 세균발육 억제작용을 가지고 있으며, 식중독과 감기 예방 및 입안 세균 번식 억제에 효과적임이 알려져 있으며, EGCG 등의 카테킨류의 항염증 작용에 대한 연구보고도 있다. 따라서 **녹차가 항염증 연고제 개발의 좋은 원료**가 될 수 있을 것으로 사료되며, 특히 **녹차농축액의 경우 과학적 성분 분석과 추출조건의 확립, 추출조건에 따른 항염증 활성의 우월성 검증 등의 연구를 통해 효과적으로 제품 개발로 연결될 수 있을 것**으로 보인다.

본 과제에서 추구하는 최종 연구목표는 현재 **‘보성녹차영농조합법인’에서 제조, 판매되고 있는 ‘녹차농축앰플’을 이용하여 항염증 효과를 가지는 연고제로의 개발 가능성을 검토하고자** 하는 것으로, **1) 녹차추출물의 유효 항염증 활성 물질의 정량법 확립을 통한 시험방법 설정과 상품의 표준화 및 항염증 성분의 추적, 2) 항염증 효과를 극대화하기 위한 분획 추출방법의 적정조건 확립, 3) 항염증 효과를 중심으로 한 생리활성의 평가와 기전 규명을 통한 약리학적 검증**을 목표로 한다. 본 과제를 통하여 도출된 결과는 **향후 녹차추출물을 이용한 항염증 연고제 개발로 연결**하고자 한다.

제 3 절. 연구개발의 범위

1) 녹차추출물의 유효 항염증 활성 물질의 정량법 확립을 통한 시험방법 설정과 상품의 표준화 및 항염증 성분의 추적

녹차를 이용한 제품의 고부가가치화와 상품으로의 개발을 위해서는 녹차 추출물의 유효 활성 물질의 함량 분석을 위한 정량법 확립과 상품 균질성을 확보하기 위한 표준화 작업이 필요하다. 또한 새로운 부가가치를 창출하기위한 녹차의 응용성 연구가 필수적이다. 유효 활성 물질의 함량 분석 대상으로는 우선 catechin 유도체들이 있으며 이는 크게 6종의 유도체로 대별할 수 있다. 이는 epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin (EGC), catechin, gallic acid 와 epicatechin (EC)으로 분류되며 그 밖의 성분으로 caffeine이 있다. 따라서 **이들 물질의 함량 분석은 상품의 품질 유지 차원에서 필수적**이다. 또한 본 과제의 수행 과정에서 녹차추출물 각 분획이 함유하고 있는 유효 생리활성 성분의 함량을 분석함으로써 생리활성에 주로 기여하고 있는 성분을 제시할 필요가 있으며, 이를 위하여 다음의 연구를 수행하고자 한다.

- **보성녹차추출물의 항염증 분석에 적당한 분석법을 개발하여 추출물중 항염증 성분의 추적**에 이용 한다.
- **항염증 지표 물질에 대한 정량성을 확립함으로써 기준 및 시험방법 설정과 quality control을 통한 녹차 상품 표준화에** 이용 한다.
- 보성녹차추출물 분획 시료의 각 단계에서의 항염 활성 성분을 정량함으로서 녹차 추출물의 항염 활성과 각 함유성분의 관련성을 제시하여 추후 진행 예정인 항염증 연고제 개발의 기초 자료로 이용하고자 한다.

2) 녹차추출물 유래의 항염증 활성 성분 분리

- 보성녹차추출물을 분획하여 항염증, 항산화 활성을 나타내는 생리활성 유효분획을 제조:
  녹차추출액을 감압 등에 의해 가능한 한 저온에서 용매를 제거하고 엑스로 함. 여기에서 얻은 extract를 물에 현탁시키고 hexane, chloroform, ethyl acetate 또는 n-BuOH 등의 용매로 추출하여 각각 H2O, hexane, chloroform, ethyl acetate 및 n-BuOH에 가용인 fraction을 얻음. 여기에서 얻어진 표준엑스 및 소분획들에 대하여 항염증 및 항산화 활성의 존재여부 및 활성정도를 측정한다.
- 항염증 및 항산화 활성성분의 분리 및 정제:
  위에서 분획한 extract를 silica gel column chromatography를 실시하여 소분획으로 나눈다. 이

소분획을 silica gel column chromatography 및 reversed phase column chromatography 또는 MPLC, HPLC 등의 각종 column chromatography를 이용한 분리방법을 통하여 함유 성분을 순수하게 분리, 정제한다.

- 생리활성 성분의 화학구조 분석:
  소분획으로부터 분리, 정제된 성분들에 대하여 각종 분광학적인 기기분석 자료 [UV, IR, MS, NMR (1D- 및 2D-NMR) 등의 분광학적인 정보]를 얻어 이로부터 구조를 결정하고 동정. 이 중 미지물질인 경우는 각종 분광학적 측정을 실시하여 구조를 해석하고 기지물질인 경우는 표준물질과 비교하여 동정한다.

3) 항염증 관련 생리활성의 평가와 기전 규명을 통한 약리학적 검증

염증 반응과 관련되는 세포 변화 과정에서 iNOS의 발현 및 활성 변화가 유도되고 그로 인해 NO 생산을 증가시키고 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현 역시 증가하여 다양한 prostaglandin 생산을 초래하게 되므로, 이들 iNOS와 COX-2 발현 변화는 염증반응 매개에 매우 중요한 역할을 한다. 뿐만 아니라, 이들 효소의 발현을 직접 조절하게 되는 전사조절인자로 NF-kB의 활성이 관련됨이 밝혀져 있으므로 NF-kB 활성 변화 역시 염증성 병변의 진행과 밀접한 관련성을 가지고 있다. 따라서 염증반응의 세포 모델을 이용하여 다음의 내용을 중심으로 평가하고자 한다.

- 녹차추출물과 분획 추출물, 녹차추출물 중 함유된 항염 활성성분 등의 항염증 효과를 검증하고 세포 내 약물작용 타겟을 규명한다.
- 녹차추출물 중 함유된 다양한 유효성분들과 항염증 효과와의 상관관계를 규명하고, 이를 근거로 성분-항염증 활성 간의 표준화를 확립한다.
- 녹차추출물 중 함유된 항염 활성성분이 염증 과정에서의 세포손상을 매개하는 산화성 스트레스로부터 세포를 보호하는 항산화 효과를 가지고 있는지와 그 자체의 독성 여부를 확인한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

1) 관련분야의 국외 연구개발 현황

본격적인 노령화 사회로 진입하고 있음에 따라 노화연구와 더불어 건강한 생활(wellbeing)에 대한 사회적 관심이 고조되고 있음은 세계적 추세이다. 따라서 **세계적으로 웰빙 식품으로 인정되고 있는 녹차 추출물에 대한 연구는 범위가 점차 확장**되고 있으며 특히 최근 들어 카테킨 유도체들의 항염증 효과에 대한 연구가 급증하고 있다. 이와 더불어 녹차 성분 분석에 관한 연구도 매우 활발한 상황이다. 더욱이 그 적용 분야에 대한 특허출원이 활발한 데 비하여 우리나라의 특허출원 건수는 미약한 상태이다.

녹차성분의 항염증 작용에 대하여는, 녹차 중 다량 함유된 EGCG를 중심으로 하여 항산화활성, chemopreventive effect와 관련하여 여러 가지 염증 매개 신호전달과정에 영향을 미침이 보고되면서 많은 관심과 연구가 진행되고 있다. 그러나 아직까지 **녹차 성분의 항염증 효과를 이용하여 피부 연고제로의 개발이 이루어지지는 않고 있으며, EGCG 이외의 다른 녹차 성분이 염증 과정에 미치는 영향 또한 충분히 밝혀지지 않은 상태**이다.

2) 관련분야의 국내 연구개발 현황

녹차의 생활화를 통하여 녹차의 소비가 유지되고 있으나 이제 **새로운 수요를 창출하여야 할 시점에 도달**하였다고 생각된다. 이는 이미 언급한 세계적 추세에서도 보듯이 녹차 관련 상품의 부가가치를 높이기 위한 새로운 적응증 발굴 연구가 근년 들어 가속화 되었다는 사실에서도 녹차는 분명히 유효 생리활성 성분을 다량 함유하고 있으며 많은 연구자들이 이를 밝혀내고 있다. 상대적으로 국내의 연구는 간헐적으로 이루어지고 있어 이에 대한 환기가 필요하다.

보성 녹차농축액은 우리나라 제일의 녹차 재배, 생산 단지인 전남 보성에서 재배된 녹차를 선별하여 녹차의 풍미와 유효성분, 기능 등을 효과적으로 보존, 추출한 제품으로 시판되고 있다. 녹차의 유효성분은 재배 기후조건이나 토양 등 환경의 영향을 절대적으로 받게 되는데, 전남 보성

지역의 녹차는 예로부터 좋은 품질의 차로 인정받아왔다. 최근 녹차를 이용한 다양한 상품 개발이 많은 관심의 대상이 되고 있으며, **단순한 건강음료로서의 이용을 넘어 이를 이용한 고부가가치 제품의 개발은 농촌 소득 증대 및 녹차의 상품가치 극대화를 통한 지역발전에 기여하기 위해 절대적으로 필요하나, 구체적인 상품, 특히 의약품으로의 개발로 연결되는 체계적인 연구는 효과적으로 이루어지지 않고** 있다.

Table 1. 녹차의 유용성 증대를 위한 국내외 연구개발 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
National Institute of Standard and Tech/ USA	녹차의 유용 성분 연구	상품의 QC
The Chinese Academy of Sciences	지역별 계절별 녹차의 유효성분 연구	우수 녹차 상품의 개발
NIH/NCI	자외선각화증(紫外線角化症 : Actinic keratosis)에 대한 녹차 카테킨의 유효성 연구	우수 녹차 상품의 개발
University of California	방사선 유발 피부독성에 대한 녹차 및 홍차추출물의 피부보호효과 연구	녹차의 유용성 확대
가톨릭대학교 강남성모병원/보성녹차 영농조합법인	녹차 카테킨을 이용한 여성 위생용품의 개발 연구	우수 녹차 상품의 개발

제 2 절. 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- **천연물 활성 성분 분석법 확립**

천연물로부터 의약품 등, 고부가가치 상품으로의 개발 및 상품화를 위해서는 효능을 나타내는 성분의 정확한 정량법이 확립되어야 한다. 녹차추출물의 유효 생리활성 물질의 정량법은 HPLC 방법이 주류를 이루고 있으며 gallic acid, epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate의 동시 정량을 주 목표로 하고 있다. 분석 기술적으로 유사 화합물의 동시 정량을 위해서는 대부분의 경우 gradient mobile phase program이 주된 방법으로 현재 6종의 분석법이 발표되어 있다. 단일 혼합 mobile phase를 사용하는 isocratic method도 2가지 발표되어 있으나 본 연구에서는 녹차에 다량 함유되어 있는 caffeine 분석이 추가

되어 있어 상기 방법으로는 분석이 불가능 하다. 따라서 본 연구에서는 분석하는데 시간과 조작이 간편한 새로운 isocratic method를 개발하여 gallic acid, caffeine, epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate(7종)를 30분 내에 동시 정량할 수 있는 분석법을 확립 하였다. 기존의 분석법과 본 연구에서 개발한 분석법을 비교하면 아래 table과 같다.

<본 연구에서 개발된 분석법>

Mobile-phase	HAc:MeOH:N.N-Dimethylformamide:H2O = 2:3:30:165
Gradient elution	**Isocratic**
Condition	flow rate: 1 mL/min μ-Bondapak^{TM} C_{18} (3.9 x 300mm)
Results	within 30 min **gallic acid, caffeine, epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate**

1. Study of Catechin and Xanthine Tea Profiles as Geographical Tracers. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 1833-1839.

Mobile-phase	(A) water/acetonitrile/formic acid (94.7:4.3:1 v/v) (B) water/acetonitrile/formic acid (49.5:49.5:1 v/v)
Gradient elution	STEP 1: start at 90% solvent A and 10% solvent B STEP 2: increase linearly to 30% solvent B in 10 min STEP 3: increase linearly to 80% solvent B in 5 min STEP 4: for an additional 3 min at 80% solvent B
Condition	flow rate: 1 mL/min LichroCART RP-18-5-μm column(Merck, 25cm x 4 mm)
Results	within 20 min **gallic acid**, theobromine, theophyline, **epigallocatechin, catechin, caffeine, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate**

2. An investigation in the use of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the quantification of tea catechins. Food Chem. 2004, 87, 465-470.

Mobile-phase	(A) water/methanol/formic acid (74.7:25:0.3 v/v) (B) acetonitrile/formic acid (99.7:0.3 v/v)
Gradient elution	STEP 1: t = 0 min, 100% solvent A STEP 2: t = 8 min, 100% solvent A STEP 3: t = 33 min, 100% solvent B STEP 4: t = 38 min, 100% solvent B STEP 5: post run time = 5 min
Condition	flow rate: 1 mL/min(4.6mm column), 0.5 mL/min(3.0 mm column)

	Luna™ 5μm C-18 column(Merck, 25cm x 4.6 or 3.0 mm)
Results (SIM-MSD)	within 20 min gallocatechin, **epigallocatechin gallate, catechin, epigallocatechin gallate, epicatechin,** gallocatecin gallate, **epicatechin gallate**

3. Analysis of Mixture of Catechins, Flavones, Flvanones, Flavonols, and Anthocyanidins by RP-HPLC. Analytical Lett. 2004, 37, No.1, 157-165.

Mobile-phase	(A) 0.05% TFA in water (B) 0.05% TFA in acetonitrile
Gradient elution	STEP 1: t = 0 min, 88% solvent A and 12% solvent B STEP 2: t = 25 min, 79% solvent A and 21% solvent B STEP 3: t = 30 min, 75% solvent A and 25% solvent B STEP 4: t = 35 min, 25% solvent A and 75% solvent B STEP 5: t = 60 min, 100% solvent B
Condition	flow rate: 1 mL/min, T = 21℃ LiChrosorb RP 18 column(4 x 125 mm, 7μm)
Results	within 40 min **epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate,** rutin, apigenin-7-O-neohesperidoside, quercetrin, neohesperedin, pelargonidin, quercetin, luteolin, naringenin, hesperetin, kaempferol, pinocembrin

4. Determination of Catechin Compounds in Korean Green Tea Infusions under Various Extraction Conditions by High Performance Liquid Chromatography. Bull. Korean Chem. Soc. 2005, 26, No.5, 747-754.

Mobile-phase	(A) 50/50 vol% acetonitrile/water with 0.1% TFA (B) 5/95 vol% acetonitrile/water with 0.1% TFA
Gradient elution	STEP 1: t = 0 min, 10% solvent A and 90% solvent B STEP 2: t = 10 min, 20% solvent A and 80% solvent B STEP 3: t = 20 min, 20% solvent A and 80% solvent B STEP 4: t = 35 min, 50% solvent A and 50% solvent B STEP 5: t = 40 min, 50% solvent A and 50% solvent B STEP 6: t = 45 min, 10% solvent A and 90% solvent B STEP 5: t = 50 min, 10% solvent A and 90% solvent B
Condition	flow rate: 0.02 mL/min Alltima C18 microcolum (0.5 mm x 300 mm, 5μ) C18 column (4.6 mm x 300 mm, 5μ)
Results	within 50 min **epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate**

5. HPLC Analysis of Naturally Occurring Methylated Catechinbs, 3″- and 4″-Methyl-epigallocatechin Gallate, in Various Fresh Tea Leaves and Commercial Teas and Their Potent Inhibitory Effects on Inducible Nitric Oxide Synthase in Macrophages. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 7035-7042.

Mobile-phase	0.1 M sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 2.5) containing 0.1 mM ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (Na2EDTA)/acetonitrile (87/13 v/v)
Gradient elution	-- Isocratic
Condition	flow rate: 1 mL/min, T = 30℃ Cosmosil 5 C18-MS packed column(Nacalei Tesque, Inc., 250mm x 4.6 mm, 5 μm)
Results	within 50 min **epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, gallocatechin gallate,** epigallocatechin-3-O-(4-O-methyl) gallate, epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl) gallate, 4′-methyl epigallocatechin-3-O-(4-O-methyl) gallate, **epicatechin gallate**

6. Isolation and Determination of Phenolic Compounds in Fruit-Green Tea. J. of Liquid Chrom. & Related Tech. 2004, 27, No.1, 31-48.

Mobile-phase	(A) methanol (B) water(pH = 2.5)
Gradient elution	STEP 1: t = 0 min, 20% solvent A and 80% solvent B STEP 2: t = 10 min, 31% solvent A and 69% solvent B STEP 3: t = 17 min, 31% solvent A and 69% solvent B STEP 4: t = 32 min, 55% solvent A and 45% solvent B STEP 5: t = 40 min, 80% solvent A and 20% solvent B
Condition	flow rate: 0.5 mL/min Symmetry Shield C18 (Merck, 150 mm x 3.9 mm, 5 μm)
Results	within 50 min **gallic acid**, protocatechuic acid, **catechin,** chlorogenic acid, p-hydroxybenzoic acid, **epigallocatechin gallate,** caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, rutin, rosmarinic acid, myricetin, quercetin, kaempferol

7. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A 1998, 793, 265-274.

Mobile-phase	(A) 0.05% TFA in water (B) 0.05% TFA in 60/40 vol% methanol/acetonitrile
Gradient elution	STEP 1: t = 0 min, 90% solvent A and 10% solvent B

	STEP 2: t = 5 min, 85% solvent A and 15% solvent B STEP 3: t = 50 min, 60% solvent A and 40% solvent B
Condition	Zorbax Eclipse XDB-C18 column
Results	within 40 min **epigallocatechin, catechin, caffeine,** L-tryptophan, **epigallocatechin gallate, epicatechin,** gallocatechin gallate, **epicatechin gallate**

8. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. Food Chem. 2000, 68, 115-121.

Mobile-phase	(A) methanol/water/orthophosphoric acid (20:79.9:0.1)
Gradient elution	**Isocratic**
Condition	flow rate: 1 mL/min Kingsorb C18 column(150 mm x 4.6 mm, 5 μm)
Results	within 60 min **gallic acid,** gallocatechin, **epigallocatechin, catechin, caffeine, epigallocatechin gallate, epicatechin**, gallocatechin gallate, **epicatechin gallate**

● **녹차 추출상품으로부터의 고부가가치 상품 개발 연구**

최근 녹차를 이용한 다양한 상품 개발이 많은 관심의 대상이 되고 있으며, **단순한 건강음료로서의 이용을 넘어 이를 이용한 고부가가치 제품의 개발은 농촌 소득 증대 및 녹차의 상품가치 극대화를 통한 지역발전에 기여하기 위해 절대적으로 필요하나, 구체적인 상품, 특히 의약품으로의 개발로 연결되는 체계적인 연구는 효과적으로 이루어지지 않고** 있다. 본 연구는 특히 이미 상품화되어 시판되고 있는 "녹차추출농축액"을 이용하여 고부가가치 상품으로의 개발로 연결함으로서 기존 상품의 가치를 곧바로 증대시키고, 결과적으로 녹차 생산 및 소비를 증가시킬 수 있는 계기를 마련한다는 데에 큰 의의가 있다. 본 연구 결과, 기존에 녹차의 항염 효과와 관련하여 제시되었던 EGCG 성분 뿐 아니라 녹차 중 다량 함유된 다양한 종류의 catechin류가 각각 항염 효과를 가지고 있음을 제시하였으며, 이들 성분의 직접적인 항염 효과는 녹차 성분의 항산화 효과와 함께 항염 연고제 개발에 있어 중요한 약리작용을 나타낼 수 있음을 제시하였다.

제 3 장　연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발의 접근방법

본 과제에서는 음용 등의 용도로 제조, 판매되고 있는 **'녹차농축액'을 이용하여 항염증 활성을 중심으로 한 생리활성을 탐색, 생리활성 지표성분을 규명하여 단순한 식품으로의 용도뿐만 아니라 의약품 제조 원료로 적용될 수 있을 것인가를 평가**하고자 하였다. **특히 본 과제에서 중점적으로 검토하고자 하는 바는 다양한 염증성 질환에 효과적인 치료 연고제 성분으로의 개발 가능성을 확인하고자 하는 것으로, 기존의 녹차농축액을 분획하거나, 또는 항염 활성 및 성분 분석 결과에 근거하여 항염 유효 성분을 규명하고, 이들의 활성이 극대화되는 조건을 확립**하고자 하였다. 본 과제의 구체적인 연구개발 접근 방법은 다음과 같다.

1) 녹차추출물

본 과제의 시험대상물질은 **보성의 녹차 추출물 ('보성녹차농축 앰플', 보성녹차영농조합법인; Fig. 1)**로서, 제조회사인 **보성녹차영농조합법인**으로부터 공급받아 4℃에 보관하면서 추출, 분획하여 시료로 사용하였다.

Fig. 1. 보성녹차농축앰플

2) 제 1 세부과제: 녹차추출물의 유효 항염증 생리활성 물질의 정량법 확립을 통한 시험방법 설정과 상품 표준화 및 항염증 생리활성 물질의 추적

녹차의 주성분인 catechin 유도체 6종 epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate

(ECG), and epigallocatechin (EGC) epicatechin (EC), gallic acid, catechin과 부수적으로 녹차에 과량 함유된 성분으로 알려진 caffeine의 동시 정량법을 확립하고자 하였다. 특히 제품의 표준화를 이루기 위한 유효 지표 물질로서 특히 epigallocatechin gallate (EGCG)를 설정하였다.

동시 정량법으로 적합한 분석법은 HPLC 법으로 현재 발표되어 있는 8종의 protocol(참고문헌 1-8)을 비교 분석하여 가급적 실행이 용이한 isocratic method가 채택되도록 실험조건을 조절하였다. 본 연구에서는 상기의 조건에 부합하는 HPLC법을 확립하였고 유효 지표 물질(7종)의 동시 정량법이 확립되어 항염증 효과와 유효 지표 물질 함유량과의 상관 관계를 연구하였다. 이 분석법은 향후 녹차 관련 제품의 균질성을 확인하거나 채취한 시료의 특성과 공정에 따른 제품의 성분 함량을 비교하여 상품의 질적 향상을 유도할 수 있을 것이다. 마지막으로 항염증 유효성분의 함량을 비교함으로써 연고제 개발의 기초자료로 활용하고자 한다.

3) 제 2 세부과제: 녹차추출물 유래의 항염증 활성 성분 분리

① 녹차 추출물의 분획 제조 및 생리활성 성분 분리

- 용매추출 및 표준 엑스, 소분획 제조

본 과제의 연구대상이 되는 녹차시료를 추출, 분획. 추출액은 감압 등에 의해 가능한 한 저온에서 용매를 제거하고 엑스로 하였다. 여기에서 얻은 methanol extract를 물에 현탁시키고 hexane, chloroform, ethyl acetate 또는 *n*-BuOH 등의 용매로 추출하여 각각 H_2O, hexane, chloroform, ethyl acetate 및 *n*-BuOH에 가용인 fraction을 얻었다.

- 표준 엑스 및 소분획에 대한 항염증 활성 검색

위에서 얻어진 표준엑스 및 소분획들에 대하여 항염증 활성의 존재여부 및 활성정도를 측정하였다.

- 항염증 활성성분의 분리 및 정제

위에서 분획한 extract를 silica gel column chromatography를 실시하여 소분획으로 나누었다. 이 소분획을 silica gel column chromatography 및 reversed phase column chromatography 또는 MPLC, HPLC 등의 각종 column chromatography를 이용한 분리방법을 통하여 함유 성분을 순수하게 분리, 정제하였다. 한편, 분리의 초기단계에서 분리해야 할 시료가 대량인 경우, 흔히 open column chromatography 방법을 사용하는데, 이를 위해서는 TLC를 통해 미리 분리할 시료의 R*f* 치가 0.2-0.8 범위에 들어가는 전개제를 찾아 사용하며, 흡착제는 주로 slica gel을 우선 사용하며, 분말 크기가 작은 것 (10-40μ)을 사용하였다. Column chromatography에 사용하는 silica gel의 양

은 시료 양의 25배 이상을 사용하며, column의 크기는 충전된 silica gel의 높이와 직경의 비가 10:1이 넘지 않도록 하였다. 시료는 적당한 용매에 녹인 후 적당량의 silica gel을 가한 다음 용매를 증발하고 건조 후 분쇄하여 분말로 한 후 column에 loading함. 유출속도는 시간당 150-300ml로 조절하면서 전개하며, 일정한 간격으로 유출되는 용액을 TLC로 monitoring함. Open column chromatography는 유출을 위한 압력으로 중력을 사용하므로 시간이 오래 걸리고 물질이 비가역적으로 흡착되거나 분해될 우려가 있으며, tailing으로 인해 분리가 불량할 수도 있으며, 대량의 용매가 사용되는 단점이 있다. 따라서, 초기의 대량 분획 이후에는 시료를 몇 개의 분획으로 나누어 주로 medium pressure를 이용하는 flash chromatography 또는 vacuum chromatography를 사용하여 시료를 분리하였다. 극성이 크고 물에 잘 녹는 시료인 경우에는 reversed phase column chromatography를 사용하는 것이 유리한 경우가 있으며, 분리할 시료의 5-10배 양 가량의 역상 흡착제 (RP-18 등)을 MeOH에 현탁시켜 column에 주입하여 사용하였다. 흡착제가 완전히 가라앉아 안정화된 다음 용매를 물로 치환. 시료를 column에 loading한 후 처음에는 물로 용출하다가 점차적으로 MeOH의 농도를 증가시켜 나중에는 100% MeOH로 용출시키는 gradient elution 방법을 사용하였다. 다음에는 MeOH와 chloroform을 사용하여 순차적으로 gradient elution을 행하였다.

② 생리활성추적분리법(Bioactivity-guidedSeparation)

생리활성 추적 분리법을 통해 분리해 나갈 때는 하나의 단계마다 얻어진 물질에 대해 생리활성 테스트를 하였다. 본 실험에서는 각 단계마다 분획된 시료를 항염증에 활성이 있는지 연구를 수행하고 활성이 있는 분획을 중심으로 다음 Fig. 2에서 보이는 바와 같은 단계로 진행하였다.

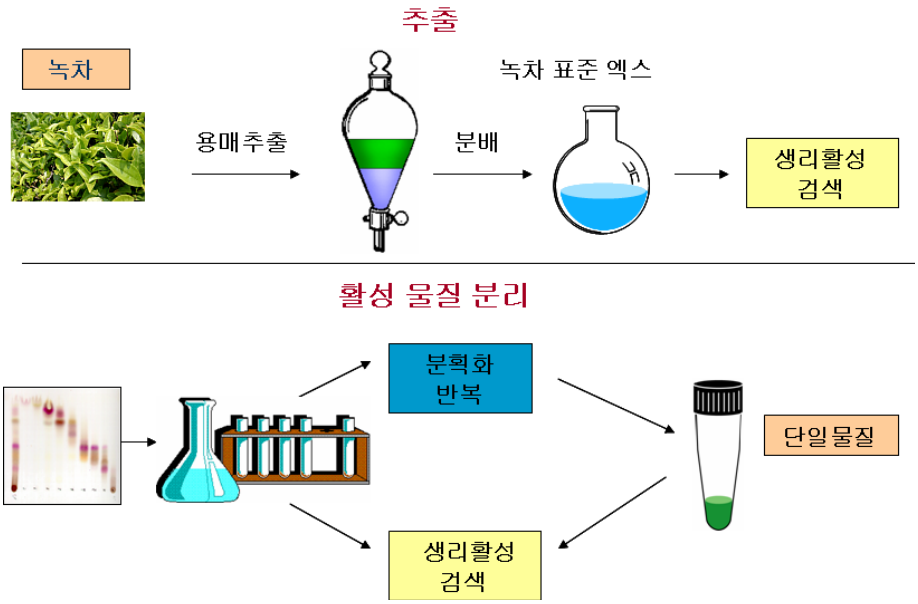


Fig. 2. 녹차의 생리활성 추적 분리법

③ 생리활성 성분의 화학구조 분석

소분획으로부터 분리, 정제된 성분들에 대하여 각종 분광학적인 기기분석 자료 [UV, IR, MS, NMR (1D- 및 2D-NMR) 등의 분광학적인 정보]를 얻어 이로부터 구조를 결정하고 동정. 이 중 미지물질인 경우는 각종 분광학적 측정을 실시하여 구조를 해석하고 기지물질인 경우는 표준물질과 비교하여 동정하였다.

식물에서 얻어지는 물질의 구조를 추정함에 있어서는 같은 과, 같은 속의 식물에서는 자주 동일하거나 유사한 화합물이 얻어진다는 것이 일반적으로 알려져 있으므로 우선 그 물질이 얻어진 식물이 속하는 과 또는 속의 식물들에서 어떠한 성분이 이미 보고되었는가를 파악하였다. 또한, 그 물질이 단리된 과정 (solubility, chromatographic behavior 등)도 이 물질이 어떠한 골격, 어떠한 계통의 화합물인가를 추정하는 데 도움이 되는 경우가 많다. 이어서, 그 물질에 대한 각종 spectroscopic data (UV, IR, NMR, MS 등)를 해석함으로써 이 물질의 골격, 계통을 보다 자세히 알 수 있다. 한편, 얻어진 화합물이 이미 보고된 물질이라면 선광도 및 물리화학적 상수 등 각종 data를 표준품과 직접 비교 또는 문헌치와 비교하여 그 화학구조를 동정하였다.

4) 제 3 세부과제: 항염증 효과를 중심으로 한 생리활성의 평가 및 기전 규명을 통한 약리학적 효능 검증

① 세포를 이용한 염증반응 모델에서의 염증 반응 지표물질 및 관련 효소 생산의 변화 측정을 통한 항염증 활성 평가 및 작용기전 규명

염증반응 세포배양 시스템을 사용하여 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 Fig. 3에서 보이는 바와 같이 세포 내 NF-kB, iNOS 및 COX-2의 발현과 활성 증가를 나타내는 염증반응 세포 모델로 사용하여 각 시료의 항염 활성을 평가함.

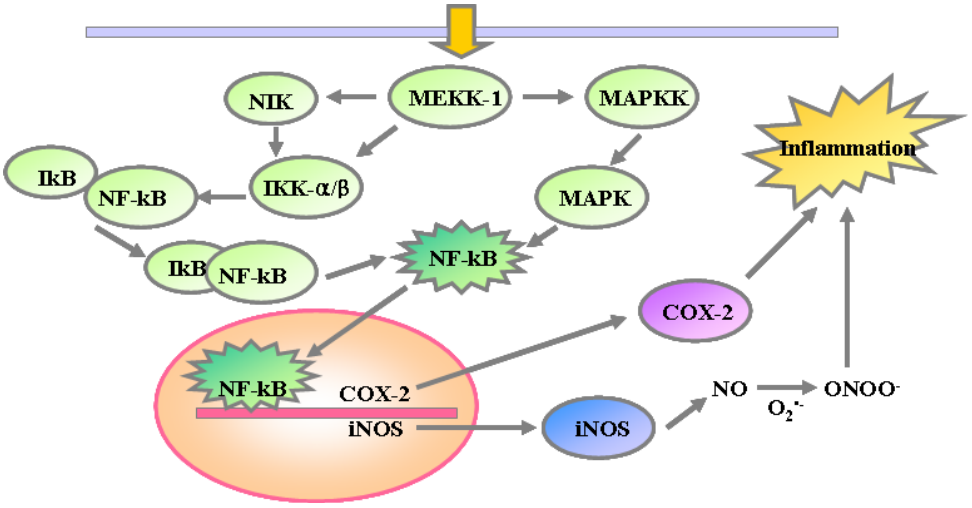


Fig. 3. 염증반응의 세포 내 신호전달기전

구체적으로, macophage cell line인 Raw264.7 cell line을 DMEM (10% FBS, without phenol red)로 배양하여 다음의 내용을 지표로 하여 염증반응의 정도를 평가하였다. 각 실험에서 항염 활성을 측정하고자 하는 시료(녹차추출물 및 유효성분)를 다양한 농도로 투여하고 positive control로서 대표적인 항염 활성 물질로 알려져 있는 dexamethasone을 투여해서 녹차추출물의 항염증 활성과 비교 평가하였다.

- NO 정량: 96well plate에 배양한 세포에 LPS 및 약물을 처리하고 배양 24시간 후에 각 well로부터 medium을 100㎕취하고 Griess Reagent와 잘 섞고 ELISA reader를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생산량을 측정하였다.

- COX-2, iNOS의 발현 변화: 세포를 직경 100mm culture plate에 배양하여 LPS 0.05 ㎍/㎖로 세포를 활성화시킨 후 각 단백 발현의 변화를 western blot의 방법으로 확인하였다.

- NF-kB 활성의 변화: 항염증 효과 평가 시스템으로 잘 알려진 NF-kB luciferase reporter assay system 또는 subcellular fractionation에 대한 western blot analysis를 이용하여 LPS에 의한 NF-kB 활성의 증가가 각 약물에 의하여 억제되는지를 평가하였다.

② 항산화 활성 평가를 통한 염증반응에서의 세포보호 효과 연구

산화성 스트레스는 반응성이 매우 강한 활성 산소기로 인해 체내에서 다양한 산화반응을 매개하게 되는 것으로, 환경오염과 화학물질, 자외선, 혈액순환장애, 스트레스 등의 직접, 간접적 원인에 의해 증가되어 각종 돌연변이나 암의 원인이 될 수 있으며, 또한 단백 변화 등에 의한 생

리적 기능 저하로 각종 질병과 노화의 원인이 된다. 염증반응과 관련한 산화성 스트레스의 역할에 대하여는, 또한 초기 염증 반응시 NO와 같은 산화성 물질의 생산이 급격히 증가하고, COX-2 효소 활성 과정에서 산화성 스트레스가 유도됨이 보고된 바 있다. **산화성 스트레스는 직접적으로 세포손상과 연결되므로 항산화 물질은 초기 염증 반응시 발생하는 산화물을 제거함으로서 염증반응 과정에서 관찰되는 세포손상으로부터 세포를 보호하는 효과를 기대**할 수 있다. 따라서 본 과제에서 녹차추출물과 각 분획에서의 항산화 활성을 평가하여 염증 반응으로부터의 세포보호 효과를 검토하였다.

구체적으로, 피부구성세포인 각질형성세포 (keratinocyte)를 배양하여 산화성 스트레스를 주어 세포손상을 유도하고, 녹차추출물이나 분획추출물, 항염 유효성분이 산화성 스트레스에 의한 세포손상으로부터의 세포를 보호하는 정도를 평가하였다.

- 세포를 24well plate에 배양하여 H_2O_2 등을 처리하여 산화성 스트레스 세포모델을 작성하였다.
- 세포손상의 평가는 세포사멸시 세포막 손상으로 인해 세포 밖으로 유출되는 lactate dehydrogenase (LDH) 효소활성을 측정함으로서 세포손상의 지표로 하였다.

③ 피부 구성 세포에 대한 세포독성 평가

피부를 구성하는 세포 중 가장 비율이 높은 각질형성세포 (keratinocyte)를 배양하여 녹차추출물 또는 분획 추출물이 세포독성을 나타내는지를 LDH assay의 방법으로 평가하였다.

제 2 절. 연구내용 및 결과

1. 녹차의 항염증 생리활성 성분의 분석법 확립

1) 표준물질을 이용한 정량법 확립

본 실험에서는 2006년 4월에 제품화된 액상추출물('보성녹차농축 앰플', 보성녹차영농조합법인)을 제공받아 녹차 시료로 사용하였다. 먼저 녹차시료의 유효성분 함량 분석을 위하여 표준시료 (gallic acid, caffeine, epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate)를 준비하여 standard로 사용하여 분석의 적정조건을 확립하고자 하였다. 구체적으로, 표준시료를 0.1mg/ml 농도로 메탄올에 잘 녹여 준비하여 10 μl를 각각 주입하여 각각의 retention

time과 순서를 확인하였다. 이들을 각기 다른 비율로 합하여 희석시킨 후 10 μl를 주입하여 나타난 peak 높이를 측정하여 각각의 표준시료가 서로 영향을 받지 않고 효과적으로 분리, 정량되는지를 확인하였다.

① HPLC 수행 조건

Column: μ-BondapakTM C18(3.9*300mm)

이동상: HAc : MeOH : N.N-Dimethylformamide : H2O = 2:3 : 30 : 165을 이용하여 isocratic elution으로 진행

이동상의 속도 및 측정조건: 1 ml/min, chart speed는 2 mm/min, wavelength는 254nm에서 측정

용매 및 시료 처리: 0.45μm membrane filter로 여과시켜 사용

분석: 각 시료 10 μl를 주입하여 나타난 peak과 표준용액 peak의 retention time과 높이를 비교하여 정량

② 표준시료에 대한 HPLC 분석 결과

다음 Fig. 4와 같이 표준시료(gallic acid, caffeine, epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate)를 준비하여 standard로 사용하여 HPLC 분석 적정조건을 확립하였다.

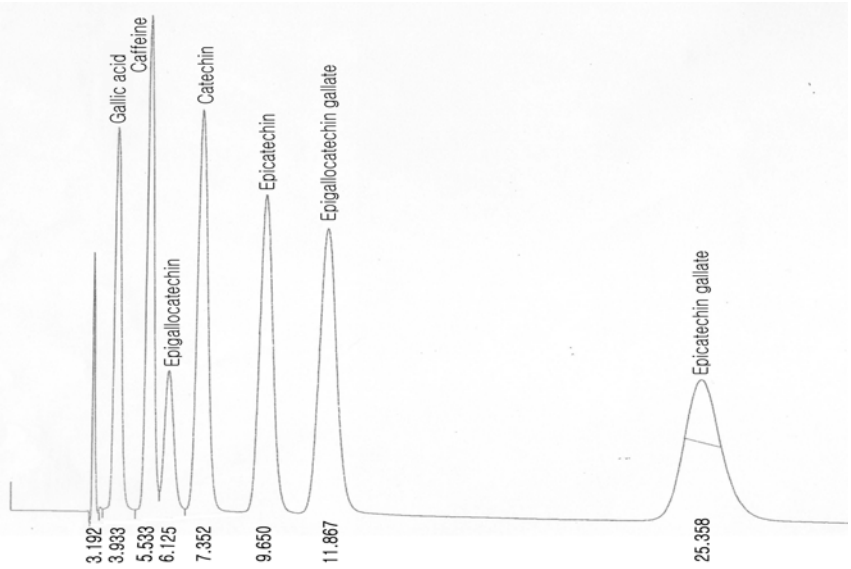


Fig. 4. 녹차 생리활성 표준시료의 HPLC 분석 pattern

2. 녹차농축액의 생리활성 성분 정량

2006년 4월에 제품화된 액상추출물('보성녹차농축 앰플', 보성녹차영농조합법인)을 제공받아 추출물 중 함유된 표준물질의 함유량을 HPLC 분석한 결과는 다음과 같다 (Fig. 5).

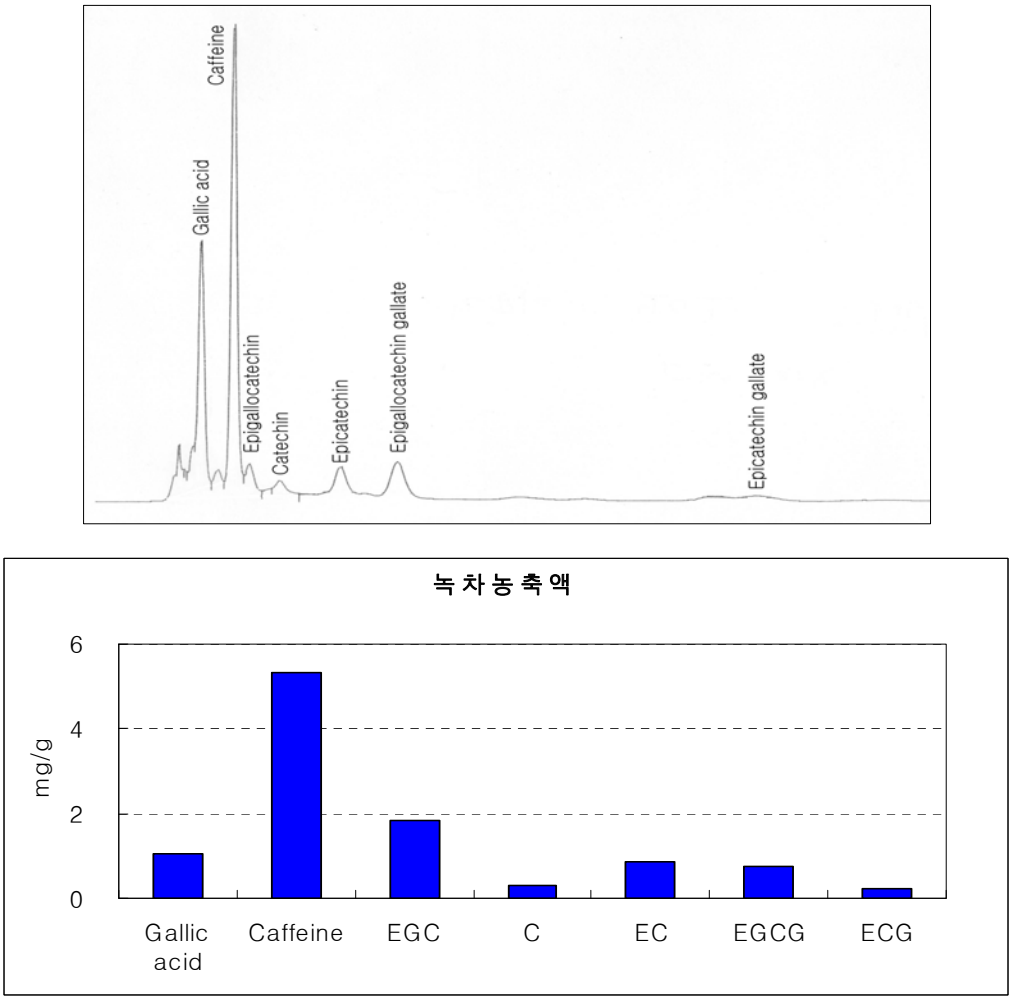


Fig. 5. 녹차농축액 중의 생리활성 성분 분석 결과

3. 녹차추출농축액으로부터의 caffeine 제거방법 확립

1) 추출 및 분획

'보성녹차농축 앰플' 중 함유된 카페인을 제거할 수 있는 방법을 검토하고자 녹차농축액 시료의 일부(건조중량 196.91g)를 정량하여 *n*-hexane, $CHCl_3$, EtOAc, *n*-BuOH, H_2O을 이용하여 순

차적으로 분획하였다 (Fig. 6).

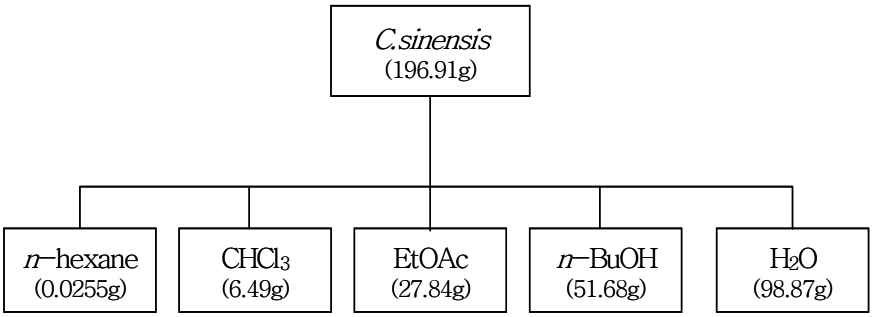


Fig. 6. 녹차(*C. sinensis*)의 추출 및 분획 과정

각각 얻어진 추출물 중 $CHCl_3$ 층에서 추출된 대부분이 카페인으로 밝혀져 카페인을 제거하기 위한 디카페인화 공정을 검토하였다. [Sakanaka, S. A Novel Convenient Process To Obtain a Raw Decaffeinated Tea Polyphenol Fraction Using a Lignocellulose Column. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2003), 51(10), 3140-3143].

2) 일반적인 디카페인화 공정

차의 카페인을 연구한 주요 논문들에 따르면 적당량의 카페인은 정상적인 성인에게는 해를 끼치지 않는 무독성으로 알려져 있다. 카페인은 혈중 또는 체내에 축적되지 않으며, 정상적으로는 섭취 후 몇 시간 이내에 모두 배설된다. 그러나 개개인별 체질에 따라 카페인에 대해 민감도가 달라진다는 것은 잘 알려진 사실이다. 카페인 민감도가 높은 사람들도 차나 커피를 즐길 수 있도록 개발된 디카페인화 공정은 씨앗에 해당하는 생두와 잎 등에 자연적으로 생성된 카페인을 생두에서 분리시킨 것을 말한다. 현재 미국에서는 생두에서 97%까지 카페인을 제거한 것을 디카페인화 커피라고 부르고 있다. 디카페인화 커피는 1903년 독일의 브레멘(Bremen)에 있는 Kaffe HAG사의 Lugwig Roselius와 Karl Wimmer 두 사람에 의해 처음 발명되었다.

이후, 커피에서 카페인을 제거하는 기술에 대한 많은 특허가 등록되었으나 크게 세 종류로 분류할 수 있다. 첫 번째는 용매로 카페인을 추출해 내는 방법이며, 두 번째는 물로 카페인을 추출해 내는 방법이다. 세 번째는 가장 최근에 개발된 기술로 액화탄산가스를 이용하는 방법으로 초임계추출법이라고 불린다.

용매로 카페인을 추출해 내는 방법은 다음의 4단계로 이루어진다.

(1) 커피원두에 증기를 공급하여 수분함량을 10% 내외에서 40%로 올린다.

(2) 용매(메틸렌 클로라이드 또는 에틸아세테이트)를 커피원두와 반대방향으로 흐르게 하여 97%의 카페인이 제거될 때까지 12시간에서 18시간 정도 카페인을 추출한다. 이 때 제거된 카페인을 함유한 용매는 별도의 카페인 정제공정을 거친 후 재사용된다.
(3) 카페인이 제거된 커피원두에 증기를 불어넣어 남아있는 용매를 모두 제거한다.
(4) 커피원두를 건조시킨다.

물로 카페인을 제거하는 방법은 카페인이 물에 잘 녹는 성질을 이용한 것으로 커피원두를 용매에 직접 접촉시키는 대신 물과 접촉시켜 카페인을 제거하는 방법이다. 제거된 카페인을 함유한 물은 용매와 접촉시켜 카페인을 제거한다. 커피원두를 배전하지 않은 상태, 즉 향기성분의 생성 전 단계에서 가공하므로 물로 카페인을 추출해 내더라도 향의 손실은 크지 않다. 용매를 사용하지 않기 때문에 안전성이 높고 용매 제거를 위해 증기를 불어넣을 필요가 없어 커피원두가 상대적으로 열에 의한 손상을 적게 받기 때문에 널리 사용된다.

초임계 추출법은 액화한 탄산가스(CO_2)를 이용한 방법으로 용매 추출법의 하나로 볼 수도 있다. 유기용매 대신 액화탄산가스를 사용하여 카페인을 추출한 후 카페인을 함유한 액화 탄산가스는 흡착제인 활성탄을 통과시켜 제거하고 재사용한다. 불활성 기체인 이산화탄소를 사용하므로 유해성분의 잔류 문제가 없고 카페인에 대한 선택성이 높아 향미의 손실을 최소화할 수 있는 장점을 가지고 있으나, 설비가 고가인 점이 단점으로 꼽힌다.

위에서 설명하였듯이 디카페인화 공정은 일반적으로 클로로포름이나 메틸렌 클로라이드와 같은 용매를 사용한다. 그러나 이들의 독성 때문에 널리 이 공법이 사용되지는 못하였다. 따라서 본 과제에서는 이 세 가지 방법들보다도 보다 안전하고 간편하게 할 수 있는 방법으로 Lignocellulose column법을 사용하였다.

3) Lignocellulose column을 사용한 디카페인화 공정

톱밥으로 만든 lignocellulose column는 tea extract로부터 decaffeinated된 tea polyphenol을 얻어 낼 수 있는 방법이다. Gallate residues를 가진 tea polyphenol, 즉 EGCG나 ECG와 같은 것들은 lignocellulose column에 흡착되며 카페인은 컬럼을 통과하게 된다. 흡착된 polyphenols은 60% ethanol을 흘려주었을 때 가장 많은 양이 녹아 나왔으며 컬럼 전 caffeine/EGCG 비율이 0.696이고 컬럼 후 caffeine/EGCG 비율은 0.004로 떨어진다 (Fig. 7).

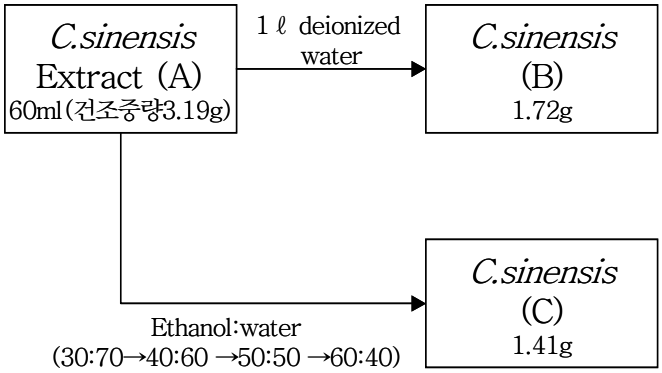


Fig. 7. Lignocellulosecolumn을 이용한 디카페인화 공정

①실험방법

Materials: Quercus류 톱밥

Preparation of lignocellulose: 크기 18-32 mesh 사이의 톱밥을 준비하여 그 무게의 10배에 해당하는 0.1 N NaOH용액에 3일 동안 담가 놓았다. 씻었을 때 갈색이 나오지 않을 때까지 반복한 다음에는 0.1 N HCl용액에 마찬가지로 3일 동안 담가 두었다. 산 처리된 톱밥을 물로 잘 씻어낸 다음 이번엔 60%의 ethanol에 하루 동안 담가 두었다. 이렇게 만들어진 톱밥을 lignocellulose column에 사용했다.

Chromatography and Analysis of Tea Extract: Tea polyphenol, EGCG, ECG, EC등은 HPLC를 사용하여 분석하였다.

Experimental:

Tea extract(3.19g)을 컬럼에 loading시킨 후 증류수를 부어 통과시켰다. 이때 tea polyphenol은 lignocellulose column에 흡착된다. 1ℓ의 증류수를 통과시킨 후 water-etanol solution을 흘려주었다. column에 흡착되어 있던 EGCG나 ECG, EC와 같은 tea polyphenol들이 녹아나왔다.

컬럼을 통과하기 전 녹차 시료(*C. sinensis*) A와 컬럼 통과 후 시료 B와 lignocellulose column에 흡착되어있던 tea polyphenol이 포함된 시료 C, 이 3가지 sample을 NP TLC를 통해 확인하였다. phenolic compound를 발색시키는 FeCl3발색제에 A와 C는 발색되었으나 B는 거의 색의 변화가 없는 것으로 컬럼 통과 후 용액에는 tea polyphenol이 거의 포함되어 있지 않는 것으로 보인다. 그 후 ethanol용액으로 흘려 내린 C에서는 다시 색의 변화가 생겼다 (Fig. 8).

A: *C. sinensis* 시료
B: lignocellulose column을 통과한 후
C: 60% ethanol로 흘려 내린 것

Fig. 8. lignocellulosecolumn처리전과후의비교

water-ethanol용액의 ethanol의 농도를 점차적으로 높여주면서 흘려주면 컬럼 표면에 흡착되어 있던 polyphenol이 녹아 나온다. 이 tea polyphenol이 포함된 *C. sinensis* C 용액을 HPLC를 사용하여 분석하였다 (Fig. 9).

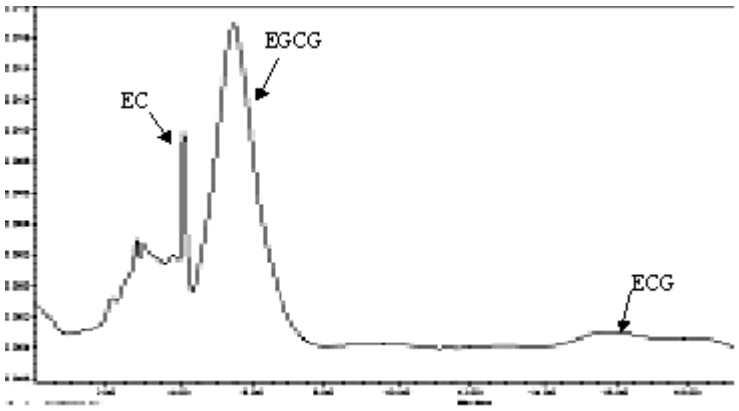


Fig. 9. 컬럼 통과 후 얻어진 용액의 HPLC를 통한 확인

②실험결과및결론

나무의 주요한 구성성분인 lignin을 포함하는 lignocellulose는 복잡한 hydrophobic compound이다. 본 실험에서는 카페인을 없애는 공정에 유기용매를 사용하지 않고 톱밥으로 만든 lignocellulose column을 사용해 tea polyphenol을 정제하였다. 이 실험결과로 보여지 듯 EGCG나 EC, ECG 그리고 Caffeine을 분리할 수 있는 쉽고 간단한 방법이다. 더군다나 lignocellulose column은 여러 번 사용하여도 컬럼의 성능이 감소되지 않는다는 장점이 있다.

4) 디카페인화 공정이 녹차농축액의 항염 활성에 미치는 영향 평가

녹차시료의 항염 활성을 체계적으로 평가하고, 각 시료간의 활성을 비교 분석할 수 있는 실험모델로 Raw 264.7 세포주를 사용하여 다양한 농도 및 시간동안 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 염증반응의 지표를 나타내는 세포모델을 작성하였다 (Fig. 10). LPS 처리에 의하여 염증반응이 유도되었음을 확인할 수 있는 일차적인 지표로 Raw 264.7 세포에서 생산, 유리되는 nitric oxide (NO)의 양을 측정하였으며, 또한 NO 생산을 직접 조절하는 효소인 inducible NO synthase (iNOS)와 염증반응의 중요한 지표인 prostaglandin 생산 효소인 cyclooxygenase 2 (COX-2)의 단백 발현 정도를 각각 western blot analysis의 방법으로 확인하였다.

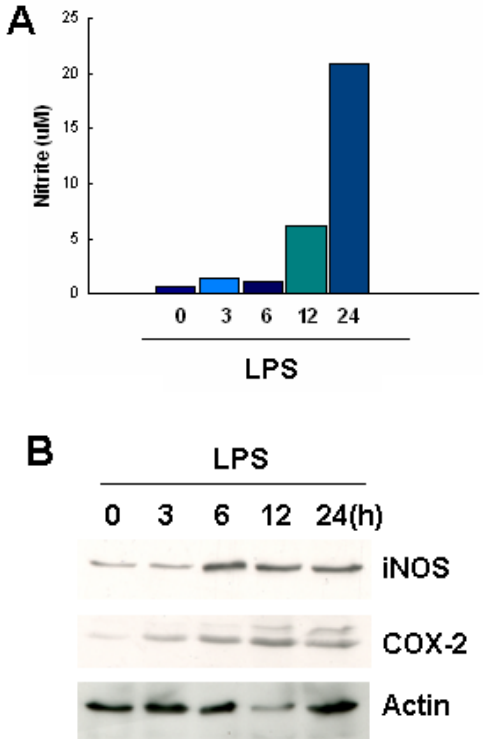
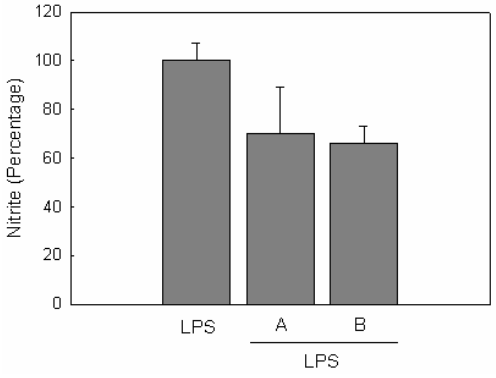


Fig. 10. (A) Raw 264.7 세포주에서 LPS 처리 후 시간 경과에 따른 NO 생산의 변화, (B) LPS 처리에 의한 세포 iNOS 및 COX-2 단백발현의 변화

녹차농축액으로부터 카페인을 제거하였을 때 시료의 항염 활성에 미치는 영향을 평가하고자, 녹차농축액 (*C. sinensis*) 시료와 lignocellulose column을 통과하여 카페인을 제거한 녹차시료의 항염 활성을 평가하였다. Fig. 11에서 보이는 바와 같이 카페인 제거로 인하여 항염 활성의 저하가 유도되지 않았다. 따라서 기존의 녹차농축액 제조 공정에 카페인 제거 과정을 추가함으로서 항염 활성은 그대로 유지하면서 음료로서의 용도로는 카페인의 단점을 최소화할 수 있는 이점을 부여할 수 있을 것으로 사료된다.



A; 녹차농축액 시료 (5 ug/ml)
B; 카페인을 제거한 녹차시료 (5 ug/ml)

Fig. 11. 녹차시료의 caffeine 제거공정이 시료의 항염 활성에 미치는 영향

4. 추출 및 분획을 통한 녹차(*Camellia sinensis*)에서의 항염 활성물질 분리

본 연구과제는 녹차에서 생리활성 물질을 찾아 의약품으로의 연구개발을 위하여 구성된 산학 협동연구의 일환으로서, HPLC와 MPLC 그리고 NMR 등 분광학적 분석 시스템을 통하여 녹차 추출물로부터 활성을 가진 항염 활성 화합물을 분리·동정하는 것을 그 범위로 한다. 이를 위하여 녹차농축액을 분획 및 MPLC를 비롯하여 여러 가지 컬럼을 통하여 여러 분획으로 나눈 후, 이에 대하여 *in vitro* bioassay 결과와 NMR을 바탕으로 얻은 분획의 분광학적 동정을 바탕으로 매우 복잡한 조성을 지닌 물질을 체계적이고 효과적으로 분리하였다.

본 연구의 방법을 대략적으로 살펴보면 다음과 같다. 우선 예비실험을 통하여 생리활성이 예상되는 시료를 대량으로 추출, 분획한다. 여기서 얻어진 분획을 여러 가지 크로마토그래프법을 통해 분리하고 정제하여 단일물질을 얻어낸 후 NMR 분석을 통해 구조를 규명하였다.

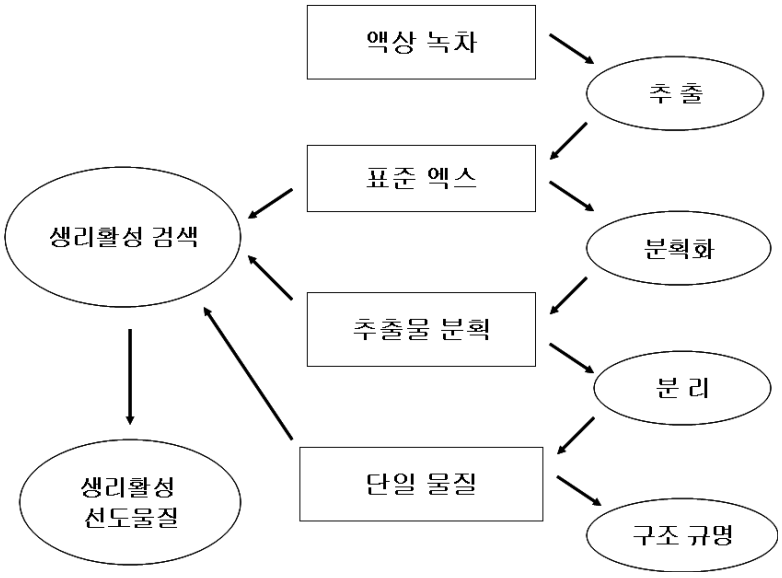
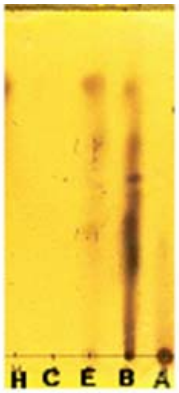


Fig. 12. 녹차에서의 생리활성 성분 분리 과정

1) 대규모 추출. 분획

추출에 자주 사용되는 용매로서는 극성이 낮은 순으로 석유 ether, hexane, benzene, chloroform, methylene chloride, ether, ethyl acetate, acetone, butanol, isopropanol, ethanol, methanol, 물 등이 있다. 적당한 용매를 써서 저온 또는 자비조건 하에서 여러 차례 추출을 한다. 가온하느냐, 하지 않느냐는 목적 화합물의 안정성과 관련이 있으며, 추출 중 화합물 변화의 위험성과 추출효율의 좋고 나쁨에 밀접한 관계가 있다.

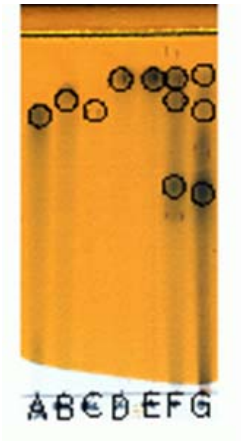
본 실험에서는 처음에는 시료를 저극성 용매인 hexane으로 추출하고 순차로 용매의 극성을 상승시키면서 chloroform, ethyl acetate, butanol, 물의순서로 추출하였다. 추출된 시료는 환류(reflux) 냉각기를 사용하여 농축하고 건조시킨다. 그리고 액체 시료를 추출할 때에는 분액깔때기(separatory funnel)를 사용하여 분리, 분획하였다. 분획한 부분에서 polyphenol류를 확인하기 위해서 phenolic compound를 발색시키는 $FeCl_3$ 용액을 사용하였다. 먼저 5가지 용매를 사용하여 분획된 시료를 확인하였다 (Fig. 13).



H: Hexane 분획
C: $CHCl_2$ 분획
E: EtOAc 분획
B: BuOH 분획
A: Aqueous 분획

Fig. 13. 분획된 부분에서 phenolic compound 확인

위 그림에서 보는바와 같이 hexane분획과 CHCl3분획에서는 FeCl3에 대한 색의 변화가 없는 것으로 보아 phenolic compound는 거의 포함하지 않는 것으로 보이며 물 층에서는 약하긴 하지만 희미한 색의 변화가 있었다. EtOAc와 BuOH 분획에서 색의 변화가 가장 뚜렷하게 보였다. 이러한 사실로 보아 두 분획에 phenolic compound가 가장 많이 들어있을 것이며 이는 이전의 논문이나 실험결과를 토대로 봤을 때 anti-inflammatory 활성이 가장 클 것이라는 것을 의미하므로 두 분획을 비교해 볼 필요가 있다. 먼저 두 분획을 standard 물질 5가지와 함께 NP-TLC를 사용하여 확인해보았다.



A: EGCG
B: ECG
C: EGC
D: EC
E: catechin
F: CSE (*Camellia sinensis* EtOAc분획)
G: CSB (*Camellia sinensis* BuOH분획)

Fig. 14. CSE와 CSB 분획의 TLC 비교

위의 그림에서 보듯이 F (EtOAc분획)와 G (BuOH분획)에서 $FeCl_3$에 발색되는 spot의 위치가 다르게 나타남을 볼 수 있다.

2)여러가지chromatograph법을이용한분리,정제

앞에서 얻어진 예비 실험결과를 토대로 phenolic compound를 분리하기 위한 실험에 들어갔다.

분획하여 얻어진 추출액은 먼저 액체 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리한다. Open column chromatography나 순상 역상 MPLC 또는 HPLC를 주로 사용하며, 고정상으로는 Silica-gel, Sephadex-LH20 등을 사용하고 이동상으로는 hexane, pet. ether, chloroform, CH_2Cl_2, EtOAc, ether, MeOH 등을 사용한다. 때로는 이들을 적절히 섞어 사용하거나 물과 섞어 사용하기도 한다.

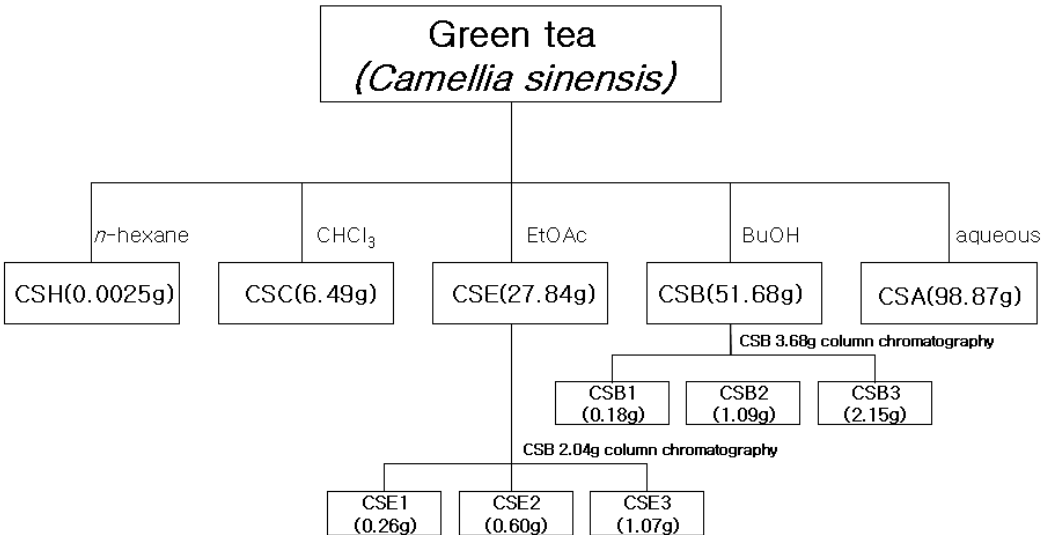


Fig. 15. 액체컬럼크로마토그래프법을 이용한 분획

①액체크로마토그래피 :

위의 도식에서 보듯이 용매로 분획한 시료에서 다음단계로 진행하기 위해 open column chromatography를 시행하였다. 실리카젤 (silica gel, 다공질의 무수 규산 SiO_2의 분말)과 같이 수분을 지니기 쉬운 담체를 컬럼에 충전하고, 여기에 물과 혼합되지 않는 용매에 녹인 혼합물을 주입한다.

이어서 같은 용매를 같은 방향으로 주입하면 담체표면의 물과 흘러 내려가는 용매 간에 시료의 분배가 일어나고 분배율의 차이에 의해 용질은 담체표면의 수상에 잔류한다. 이어서 새로운 용매가 흘러 내려오면 역시 분배율에 따라 용출하게 되므로 물에 대한 분배율이 작을수록 충전된

컬럼을 빨리 통과하게 된다.

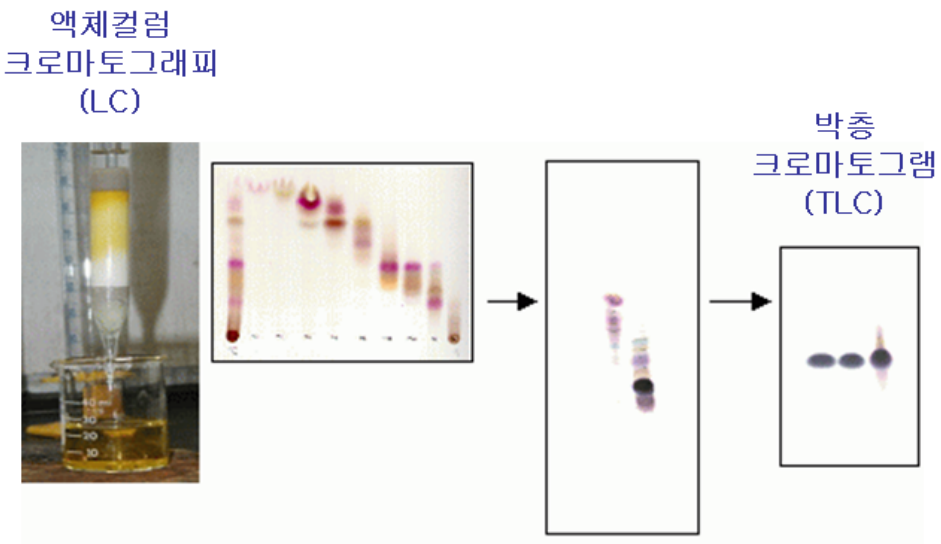


Fig. 16. 액체크로마토그래피를 통한 분리, 정제

먼저 EtOAc 분획과 BuOH 분획 각각에 대해 여러 가지 용매를 사용하여 TLC 조건을 결정하고 anisaldehyde-sulfuric acid와 $FeCl_3$ 발색제에 발색되는 spot을 확인하고 column 조건을 결정하였다.

EtOAc 분획을 column chromatography 할 때에 이동상은 $CHCl_3$: MeOH: Water=80: 16: 1의 비율로 시작하여 점차적으로 극성을 높여가며 3개의 fraction으로 나눴고 BuOH 분획은 $CHCl_3$: MeOH: Water=80: 20: 1의 비율로 시작하여 이것역시 3개의 fraction으로 분획하였다.

분리된 fraction을 6개의 standard 물질과 함께 TLC에 찍어보았다. Fig. 17에서 보이는 것처럼 EtOAc층과 BuOH층에 standard 물질과 겹치는 spot이 보이는 것을 확인할 수 있다. Gallic acid의 경우는 anisaldehyde-sulfuric acid에 발색이 되지 않으나 $FeCl_3$에는 다른 phenolic compound와 마찬가지로 발색이 되는 것을 확인할 수 있다.

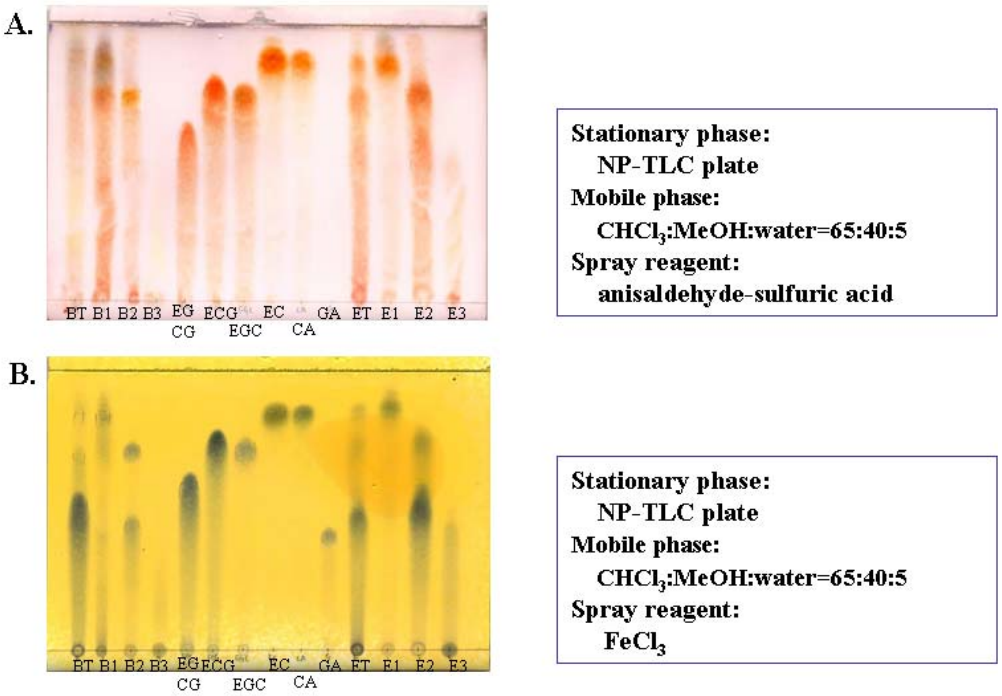


Fig. 17. 액체 컬럼 크로마토그래피 결과 (A: anisaldehyde 발색 B: $FeCl_3$ 발색)

② 역상크로마토그래피 :

Open column chromatography로 나눠진 fraction에 포함된 물질을 purification 하기 위해서는 좀 더 정밀한 분리방법이 실행되어야 한다. 보통 MPLC나 HPLC를 이용하는데 본 실험에서는 UV-Detector가 부착된 MPLC를 사용 하였다. 컬럼은 NP와 RP 컬럼 두 가지를 다 사용하였으며 RP column의 종류로는 실리카겔 담체의 표면에 실리콘 수지를 부착시키거나 또는 표면을 화학적으로 알킬화시킨 것 등이 있다. 비수계(非水系)의 용매를 고정상에 흡착시켜 사용하는데, 이러한 고정상은 극성이 작은 물질에 대하여 친화성이 강하고 반대로 극성이 큰 물질에 대하여는 친화성이 약하다. 이동상에 물이나 메탄올 등의 수계용매를 사용하면 극성이 큰 물질부터 용출되며 이러한 역상 크로마토그래피는 배당체 등의 수용성 유기화합물의 분리에 적당하다는 장점이 있다.

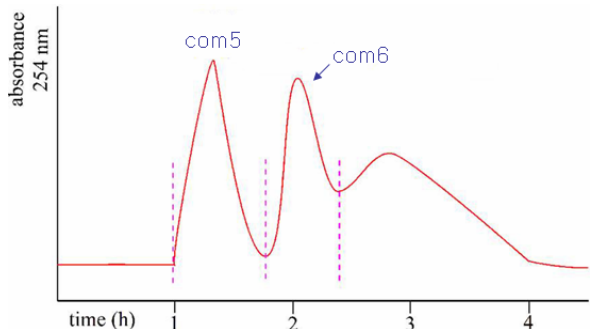


Fig.18.CSB2의 reversed-MPLC chromatogram

C_{18}-RP 컬럼을 사용하여 compound 1번에서 6번까지를 분리하였으며 이동상으로는 compound 1번과 4번의 경우에는 Water : MeOH : Formic acid= 79.7 : 20 : 0.3을 사용하였으며 2번과 3번, 5번과 6번은 Water : MeOH : Formic acid= 89.7 : 10 : 0.3을 사용하였다.

아래의 Fig. 19에서 보듯이 총 6개의 compound가 얻어졌으며 NMR 분석을 통해 구조를 밝혔다. Compd. 1은 catechin (CA)으로 확인하였으며 1.80mg을 얻었다. Compd. 2는 epicatechin gallate (ECG)이고 4.01mg을 얻었으며, Compd. 3은 epigallocatechin gallate (EGCG)이고 7.04mg을 얻었다. Compd. 4는 epicatechin (EC)이며 2.00mg을 얻을 수 있었고 Compd. 5는 epigallocatechin (EGC)이고 3.97mg을 얻었다. 마지막으로 Compd. 6은 gallic acid (GA)로 1.2mg을 얻어냈다.

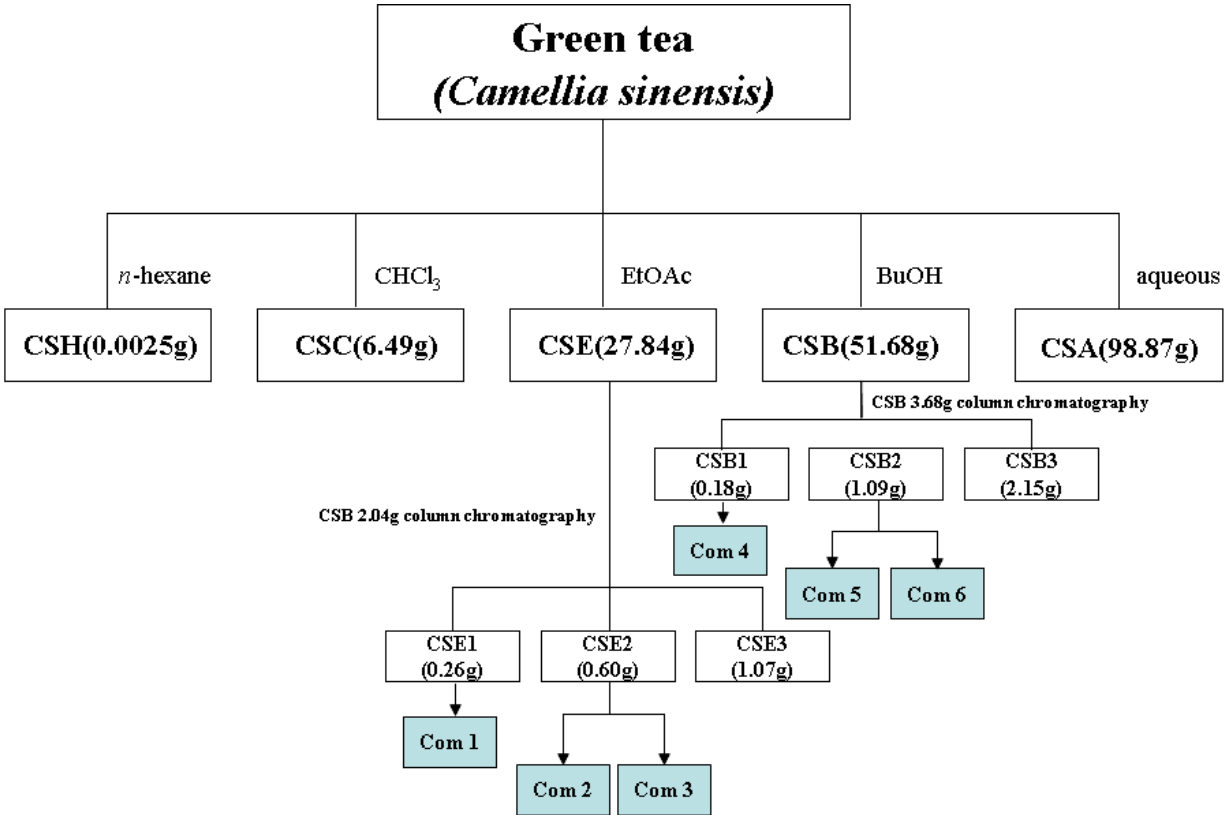


Fig. 19. 역상 크로마토그래프법을 이용한 분획

5. 항염활성 성분의 화학구조의결정

정제된 활성이 있는 단일물질의 구조를 알기위해서는 분광분석법(spectroscopy)을 이용한다. 실험실에서 주로 사용하는 방법은 UV spectroscopy, IR spectroscopy, Mass spectrometry, NMR spectroscopy, X-ray crystallography 등이 있다.

구조결정 과정에서 실험재료로 사용된 식물 또는 이 식물의 근연식물들로부터 이미 보고된 화합물들에 관한 정보가 필수적으로 요구되며, 이 외에도 융점(m.p.), 크로마토그래피에 관한 정보, 예비실험을 통하여 얻어진 정색반응에 관한 정보 등은 화합물의 기본골격과 기본골격에 결합되어 있는 관능기의 종류와 수 등을 어느 정도 예측함에 있어서 결정적인 자료를 제공하는 수단이 될 수 있으므로 이런 결과들은 화학구조의 결정에 매우 중요하다. 또한 이들 결과로부터 도출된 구조가 생합성적인 이론에 타당한지도 검토하여야 한다.

얻어진 순수물질 6개에 대한 구조를 파악하기 위해 NMR 측정을 의뢰하였다. ^{1}H과 ^{13}C NMR 그리고 UV, IR 측정 데이터를 분석하여 녹차에 들어있는 phenolic compound의 구조를 확인하였다. 다음은 각각의 compound에 대한 NMR data와 IR. UV data 그리고 활성에 관한 설명이다.

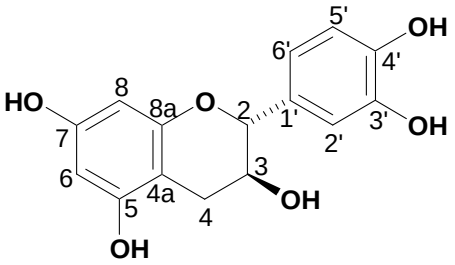
1) Compound1의 화학구조결정

이름: catechin

분자식: $C_{15}H_{14}O_6$

분자량: 290.27

구조:



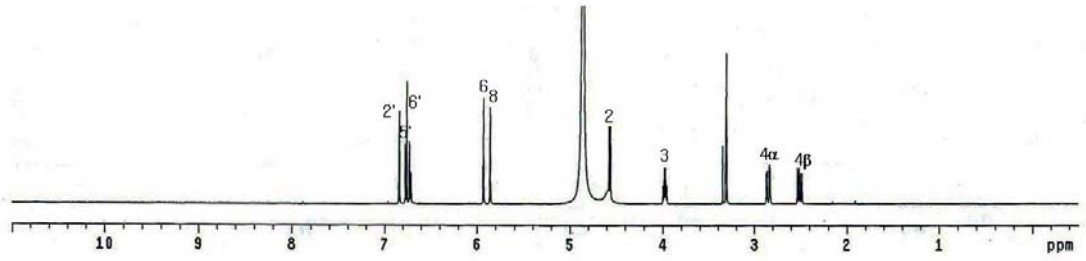


Fig. 20. Comound1의 ^{1}HNMR spectrum(500MHz, CD_3OD)

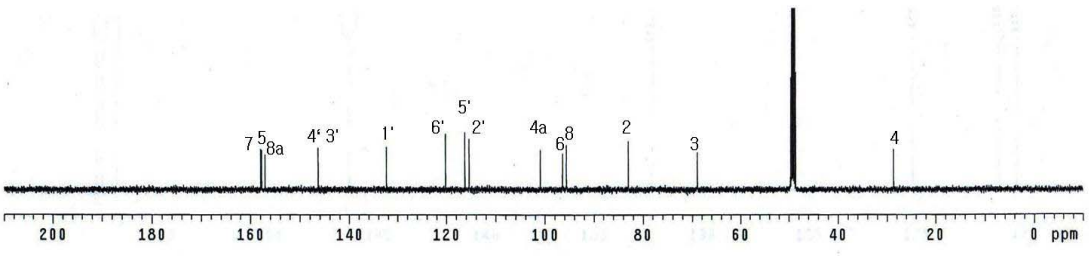


Fig. 21. Comound1의 ^{13}CNMR spectrum(500MHz, CD_3OD)

UV λ_{max} nm(MeOH): 280

IR γ_{max} cm^{-1}(KBr): 3400(OH), 1650(C=O), 1510, 1420(aromatic C=C), 1210(C-O).

Catechin의 생리활성: SciFinder Scholar(Chemical abstracts)를 통한 자료조사 결과

호중구 의존성 위염에 대한 억제효과 (Handa et al., 2002).

마우스의 귀에서의 부종 억제효과 (Kim et al., 1993).

Apoptosis에 관여하는 물질들의 m-RNA expression을 조절 (Isemura et al., 2003).

항암 촉진 효과 (Gao et al., 2003).

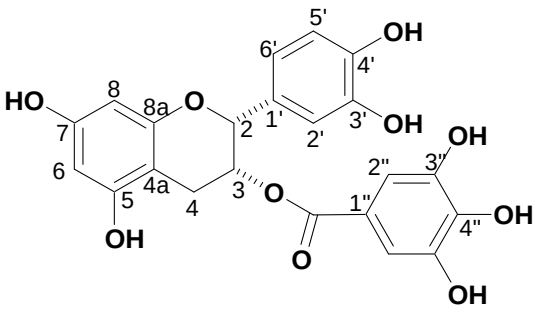
2) Compound 2의 화학구조결정

이름: epicatechin gallate (ECG)

분자식: $C_{22}H_{18}O_{10}$

분자량: 442.37

구조:



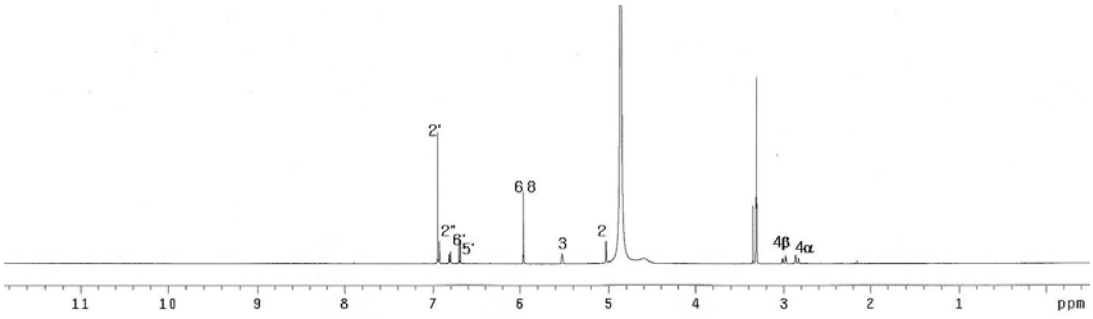


Fig.22.Comound2의 ^{1}HNMR spectrum(500MHz, CD_3OD)

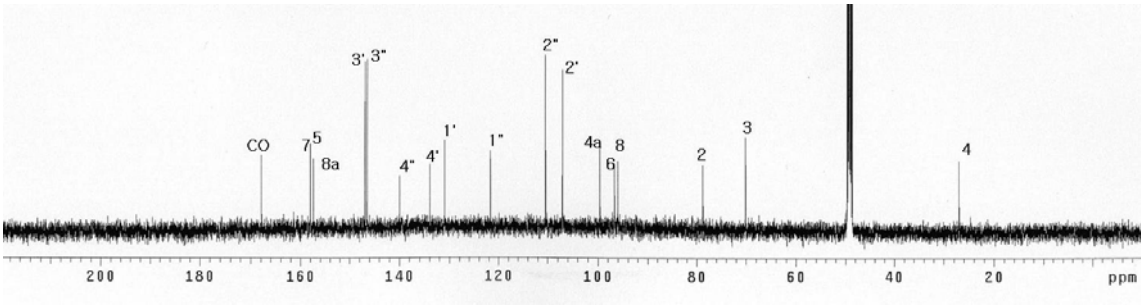


Fig. 23. Comound 2의 ^{13}C NMR spectrum (500MHz, CD_3OD)

UV λ_{max} nm(MeOH): 280

IR γ_{max} cm^{-1}(KBr): 3300(OH), 1690(C=O), 1620, 1520, 1450(aromatic C=C), 1230, 1140, 1030.

Epicatechingallate(ECG)의 생리활성: SciFinder Scholar(Chemical abstracts)를 통한 자료조사 결과

ECG 유도체의 항암효과 (Hayes et al., 2006).

항바이러스 효과 (Song et al., 2005).

ECG 유도체의 황색포도상구균에 대한 항균효과 (Anderson et al., 2005).

구강내 암세포에 대한 ECG의 in vitro 세포독성 효과 (Nissim et al., 2005).

ECG의 상처치유 효과 (Kapoor et al., 2004).

Helicobacter pylori 균에 대한 억제효과 (Yamada et al., 1997).

배양된 햄스터 세포에 대한 돌연변이 억제 효과 (Kuroda, 1996).

Beta-secretase 효소 저해효과 (Jeon et al., 2003).

ECG 및 유도체의 methicillin-내성 황색포도상구균에 대한 항균효과 (Hamilton-Miller and Shah, 2000).

3) Compound 3의 화학구조결정

이름: epigallocatechin gallate (EGCG)

분자식: $C_{22}H_{18}O_{11}$

분자량: 458.37

구조:

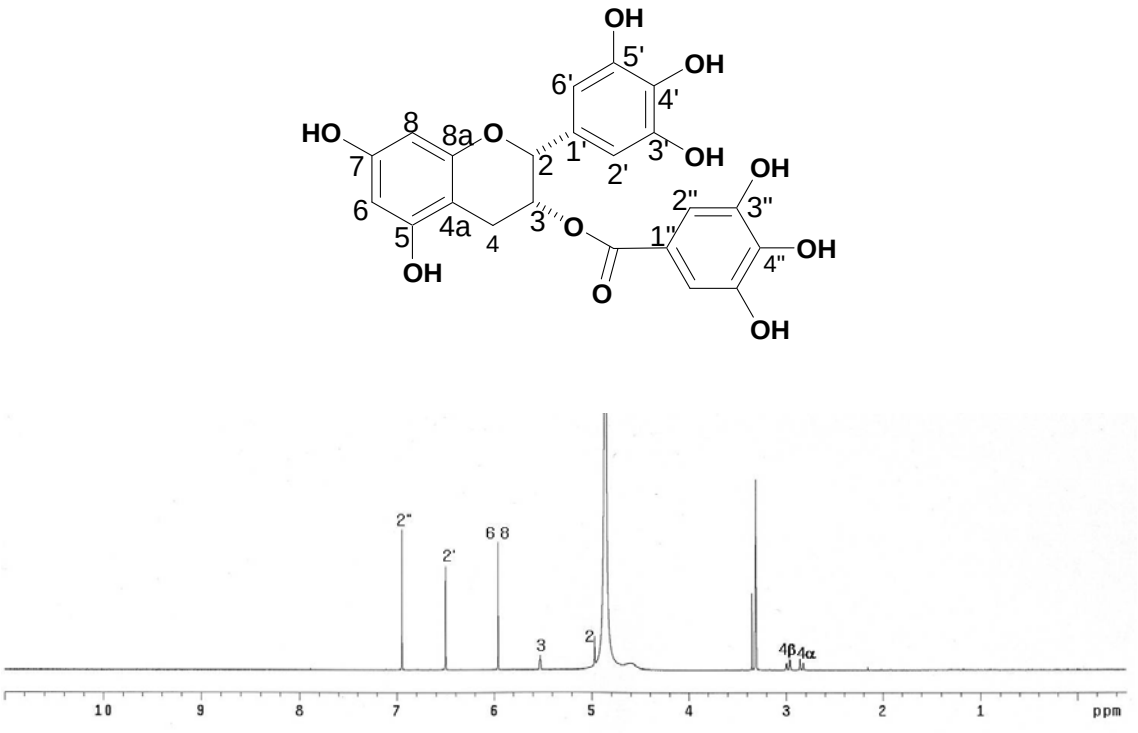


Fig. 24. Comound 3의 ^{1}HNMR spectrum (500MHz, CD_3OD)

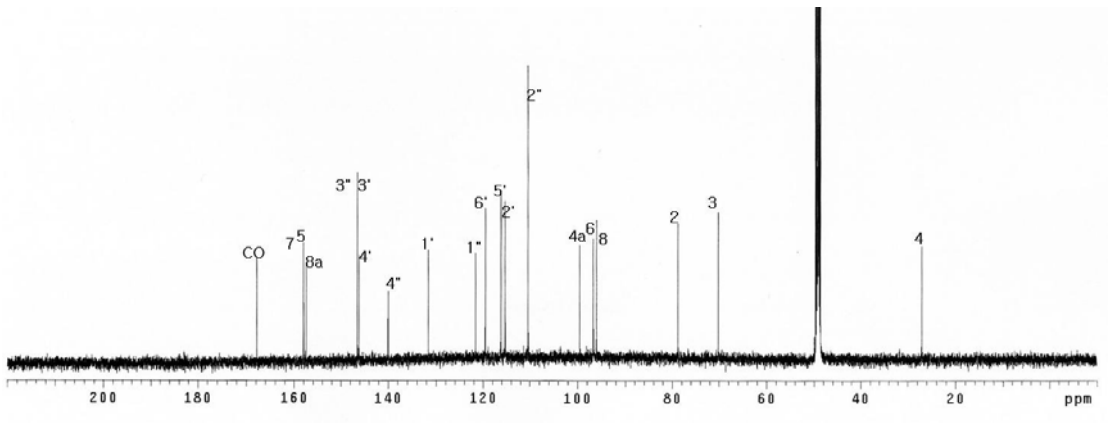


Fig. 25. Comound 3의 ^{13}CNMR spectrum (500MHz, CD_3OD)

UV λ_{max} nm(MeOH): 282.4, 313.2

IR γ_{max} cm^{-1}(KBr): 3400(OH), 1690(C=O), 1620, 1510, 1450(aromatic C=C), 1230, 1140, 1030.

Epigallocatechin gallate (EGCG)의 생리활성: SciFinder Scholar(Chemical abstracts)를 통한 자료조사 결과

간염 억제 효과 (Wang et al., 2006).

항염증 효과 (Huang et al., 2003).

염증 반응, 혈관신생 및 폐 섬유화 억제 효과 (Dona et al., 2003).

STAT-1저해를 통한 항염증 효과 (Tedeschi et al., 2002).

Nitric oxide 합성효소 induction 억제 효과 (Lin et al., 2001).

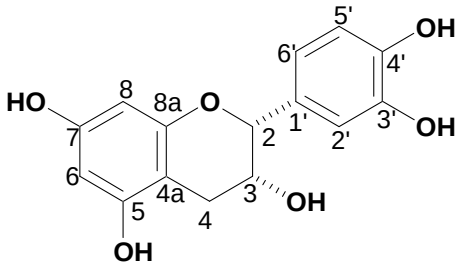
4) Compound 4의 화학구조결정

이름: epicatechin (EC)

분자식: $C_{15}H_{14}O_6$

분자량: 290.27

구조:



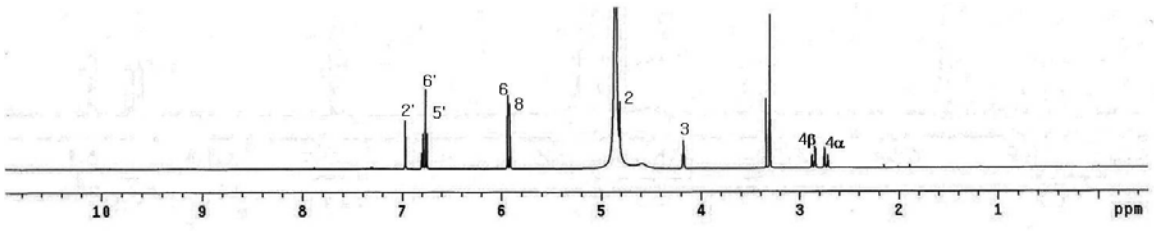


Fig. 26. Compound 4의 ^{1}HNMR spectrum (500MHz, CD_3OD)

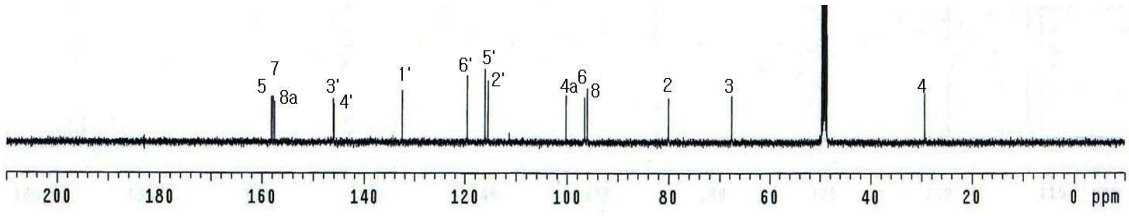


Fig. 27. Compound 4의 ^{13}CNMR spectrum (500MHz, CD_3OD)

UV λ_{max} nm(MeOH): 280

IR γ_{max} cm^{-1}(KBr): 3400(OH), 1650(C=O), 1510, 1420(aromatic C=C), 1210(C-O).

Epicatechin(EC)의 생리활성: SciFinder Scholar(Chemical abstracts)를 통한 자료조사 결과

마우스 귀의 부종에 대한 항염증 효과 (Kim et al., 1993).

Epicatechin의 항염증 효과 (Swarnalakshmi et al., 1981).

포도에서 얻어진 Epicatechin Conjugates의 세포독성 효과 (Ugartondo et al., 2006).

항암제에 대한 약효 증진 효과 (Sato et al., 2006).

항 herpes 및 항유전독성 효과 (Savi et al., 2006).

*Bacillus cereus*에 대한 항균 효과 (Friedman et al., 2006).

Epicatechin의 지질과산화 억제 효과 (Quine et al., 2005).

Epicatechin의 항산화 효과 및 항미생물 작용 (Mendoza-Wilson et al., 2006, Bae et al., 2005).

아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 Apoptosis의 억제 효과 (Heo et al., 2005).

Epicatechin의 돌연변이 유발 억제 효과 (Geetha et al., 2004).

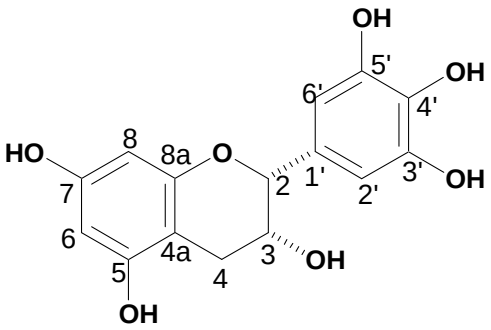
5) Compound 5의 화학구조결정

이름: epigallocatechin (EGC)

분자식: $C_{15}H_{14}O_7$

분자량: 306.27

구조:



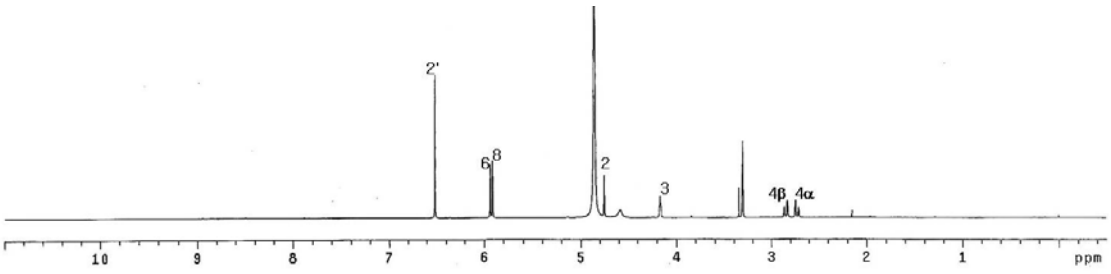


Fig. 28. Compound 5의 ^{1}HNMR spectrum (500MHz, CD_3OD)

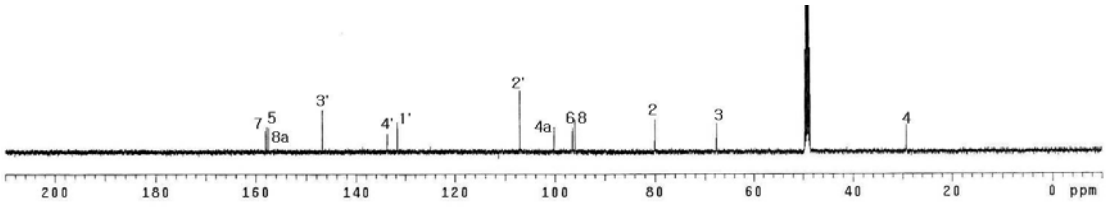


Fig. 29. Compound 5의 ^{13}CNMR spectrum (500MHz, CD_3OD)

UV λ_{max} nm(MeOH): 280

IR γ_{max} cm^{-1}(KBr): 3300(OH), 1690(C=O), 1510, 1450(aromatic C=C), 1210(C-O).

Epigallocatechin (EGC)의 생리활성: SciFinder Scholar(Chemical abstracts)를 통한 자료조사 결과

Epigallocatechin (EGC)의 암세포 성장 억제 효과 (Kennedy et al., 2002).

항암 효과 (Hara et al., 1989).

항산화 효과 (Higdon et al., 2003).

항미생물 효과 (Si et al., 2006).

돌연변이 유발 억제 효과 (van der Merwe et al., 2006).

염증반응 억제 작용 (Kobayashi et al., 2006).

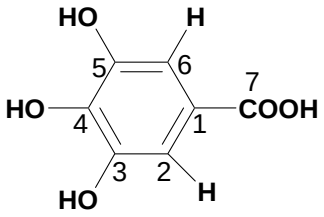
6) Compound 6의 화학구조결정

이름: Gallic acid

분자식: $C_7H_6O_5$

분자량: 170.12

구조:



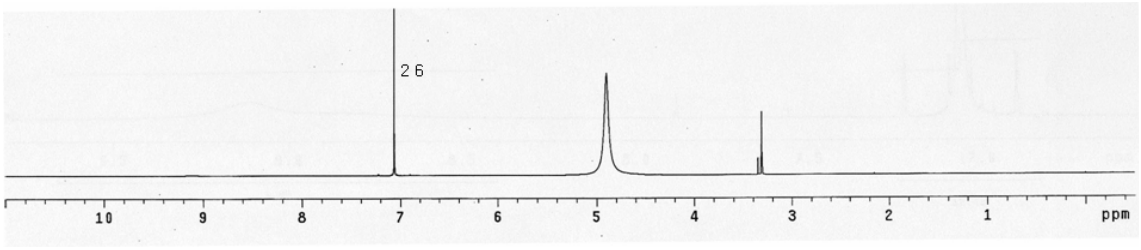


Fig. 30. Compound 6의 ^{1}HNMR spectrum (500MHz, CD_3OD)

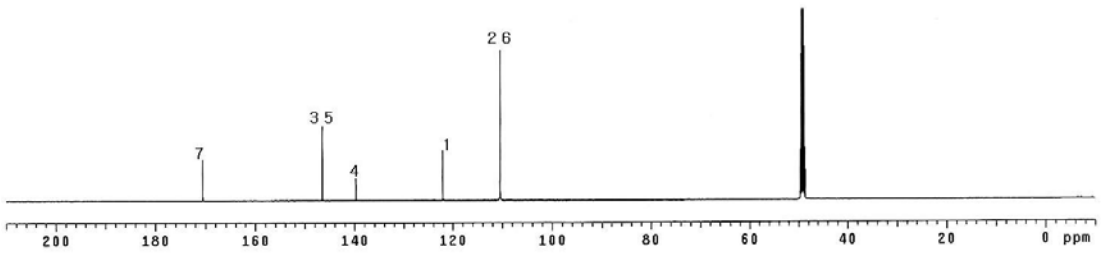


Fig. 31. Compound 6의 ^{13}CNMR spectrum (500MHz, CD_3OD)

UV λ_{max} nm(MeOH): 218,

IR γ_{max} cm^{-1}(KBr): 3320(O-H), 1690(C=O), 1620, 1520, 1450(aromatic C=C), 1345, 1260, 1050;

Gallic acid의 생리활성: SciFinder Scholar(Chemical abstracts)를 통한 자료조사 결과

항바이러스 및 항염증 효과 (Higuchi et al., 2006).

항염증 효과 (Choi et al., 2006, Yang et al., 2004).

비만세포에서의 histamine 유리를 억제 (Kim et al., 2006).

DNA polymerase 작용 저해 효과 (Mizushina et al., 2006).

Rat 대동맥에서의 혈관 수축 반응 강화 효과 (Sanae et al., 2002).

7) Compounds 1～6의 NMR data

Table 2. ^{1}H NMR chemical shift data

No.	δ_H					
	1	2	3	4	5	6
2	4.56	5.03	4.97	4.86	4.75	-
3	3.98	5.52	5.52	4.18	4.16	7.06
4a	2.85	2.85	2.84	2.74	2.73	-
4b	2.53	2.99	2.98	2.86	2.83	-
6	5.93	5.96	5.96	5.94	5.94	7.06
8	5.86	5.96	5.92	5.91	5.91	
2′	6.84	6.95	6.50	6.97	6.51	
3′	-	-	-	-	-	
5′	6.77	6.70	-	6.75	-	
6′	6.76	6.81	-	6.76	-	
2″	-	6.93	6.95	-	-	

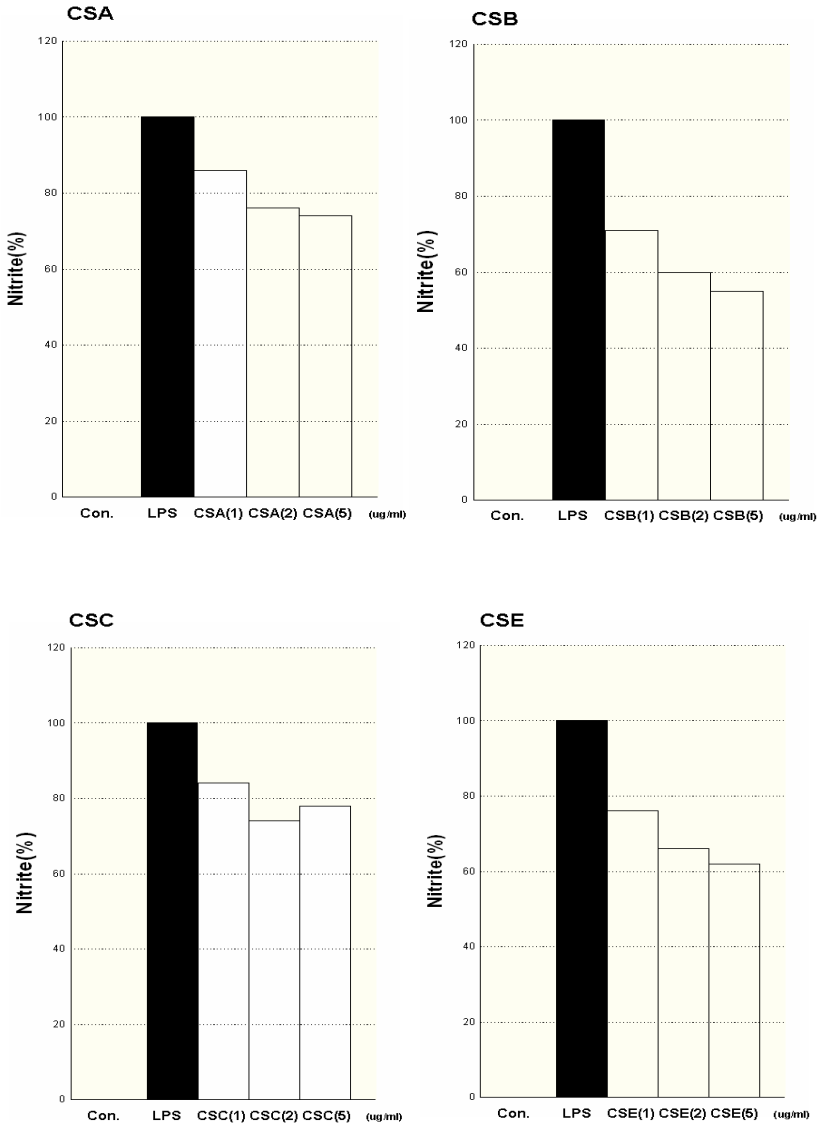
Table 3. ^{13}C NMR chemical shift data

No.	δ_C					
	1	2	3	4	5	6
1	-	-	-	-	-	122.1
2	83.0	78.8	78.8	80.0	80.0	110.5
3	68.9	70.1	70.1	67.6	67.6	139.7
4	28.7	27.0	27.0	29.4	29.3	-
4a	100.9	99.5	99.6	100.2	100.2	110.5
6	96.4	96.7	95.7	96.6	96.5	-
8	95.7	96.0	96.0	96.0	96.0	146.5
5	157.7	157.9	157.9	158.1	157.8	170.5
7	157.9	158.0	158.0	157.8	158.1	
8a	157.1	157.4	157.6	157.5	157.4	
1′	132.4	131.6	130.9	132.4	131.7	
2′	115.4	115.3	107.0	115.5	107.1	
3′	146.3	146.1	146.8	146.1	146.8	
4′	146.4	146.1	133.9	145.9	132.9	
5′	116.2	116.2	-	116.0		
6′	120.2	119.5	-	119.5		
1″		121.6	121.6			
2″		110.4	110.4			
3″		146.5	146.4			
4″		140.0	140.0			
5″			-			
6″			-			
CO		167.8	167.8			

6. 녹차농축액 분획추출물의 항염 활성 평가

1) 녹차 일차 분획의 항염 활성 평가

녹차농축추출액의 분획추출 방법에 따른 항염활성의 차이를 평가하기 위하여 제 2 세부과제로부터 *n*-hexane, $CHCl_3$, EtOAc, *n*-BuOH, H_2O을 이용하여 녹차농축앰플을 순차적으로 분획한 각 분획시료들이 LPS에 의한 NO 생산을 억제하는 정도를 측정하여 가장 우수한 항염 활성을 나타내는 분획을 추적하였다. 각 시료 1, 2, 5 μg/ml을 각각 세포에 처리하고, LPS로 염증반응을 유도하였을 때, NO 생산의 정도를 측정하여 비교, 항염 활성의 정도를 평가하였다. Fig. 32와 33에서 보이는 바와 같이 각 시료의 정도의 차이는 있었으나 항염 활성을 나타내었고, 특히 EtOAc와 *n*-BuOH 추출분획의 항염 활성이 가장 우수한 것으로 확인되었다.



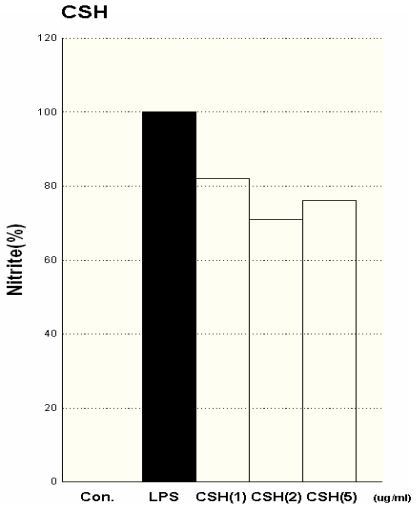


Fig. 32. H_2O (CSA), *n*-BuOH (CSB), $CHCl_3$ (CSC), EtOAc (CSE), *n*-hexane (CSH) 추출분획이 Raw 264.7 세포주에서 LPS 처리에 의한 NO 생산 증가에 미치는 영향

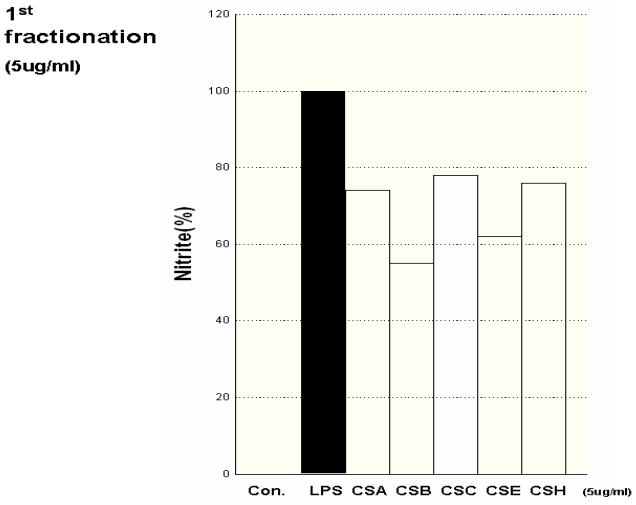


Fig. 33. H_2O (CSA), *n*-BuOH (CSB), $CHCl_3$ (CSC), EtOAc (CSE), *n*-hexane (CSH) 추출분획 각 5 μg/ml의 항염 효과 비교

2) 녹차농축액 이차 분획추출물의 항염 활성 평가

녹차앰플추출분획 중 *n*-BuOH (CSB) 및 EtOAc (CSE) 추출분획에서 가장 우수한 항염 활성을 보였으므로, 제 2 세부과제로부터 이 두 분획을 대상으로 2차 분획시료를 얻었으며, 이들의 항염 활성을 같은 방법으로 검정하였다. EtOAc와 *n*-BuOH 추출분획에서 각각 얻어진 CSB1,

CSB2, CSB3, CSE1, CSE2, CSE3 분획의 항염 활성 결과는 Fig. 34 및 35와 같다.

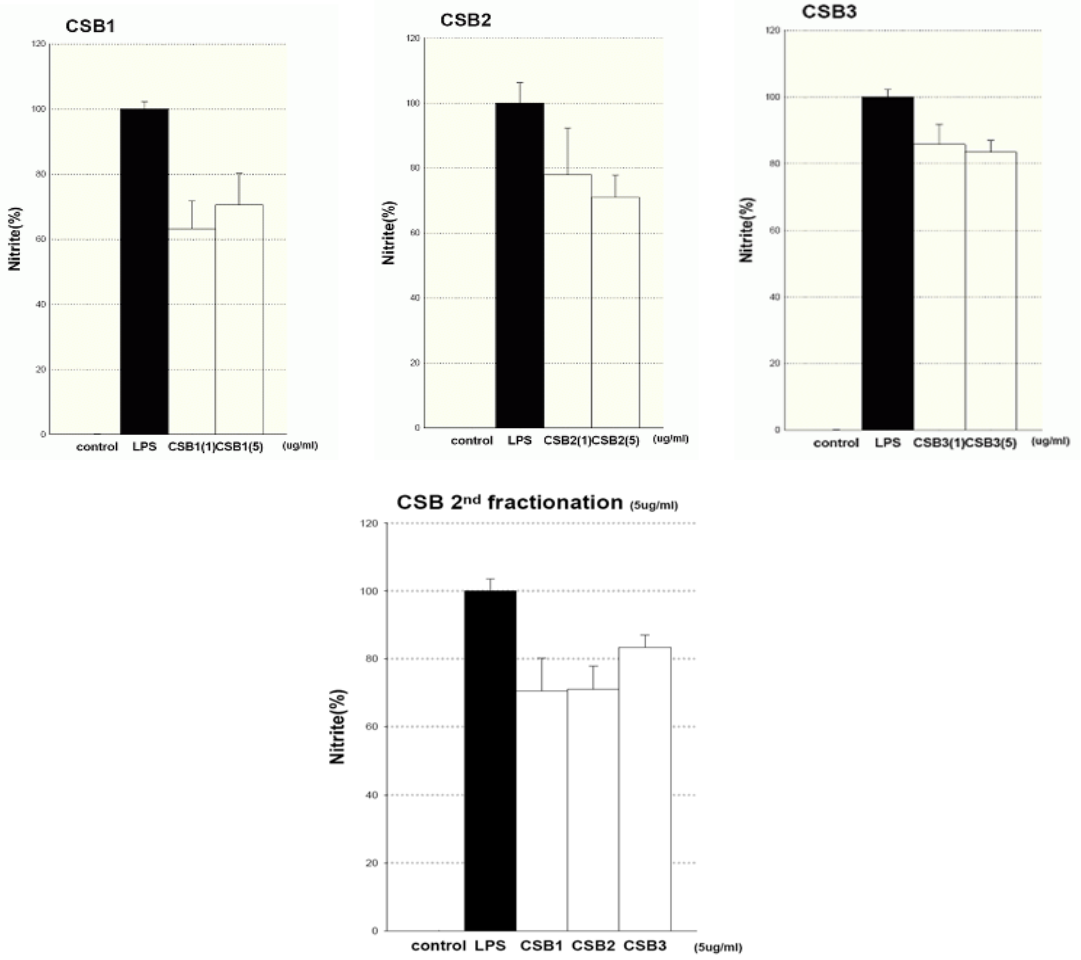


Fig. 34. *n*-BuOH (CSB)로부터 소분획화된 CSB1, CSB2, CSB3가 각각 Raw 264.7 세포주에서 LPS 처리에 의한 NO 생산 증가에 미치는 영향

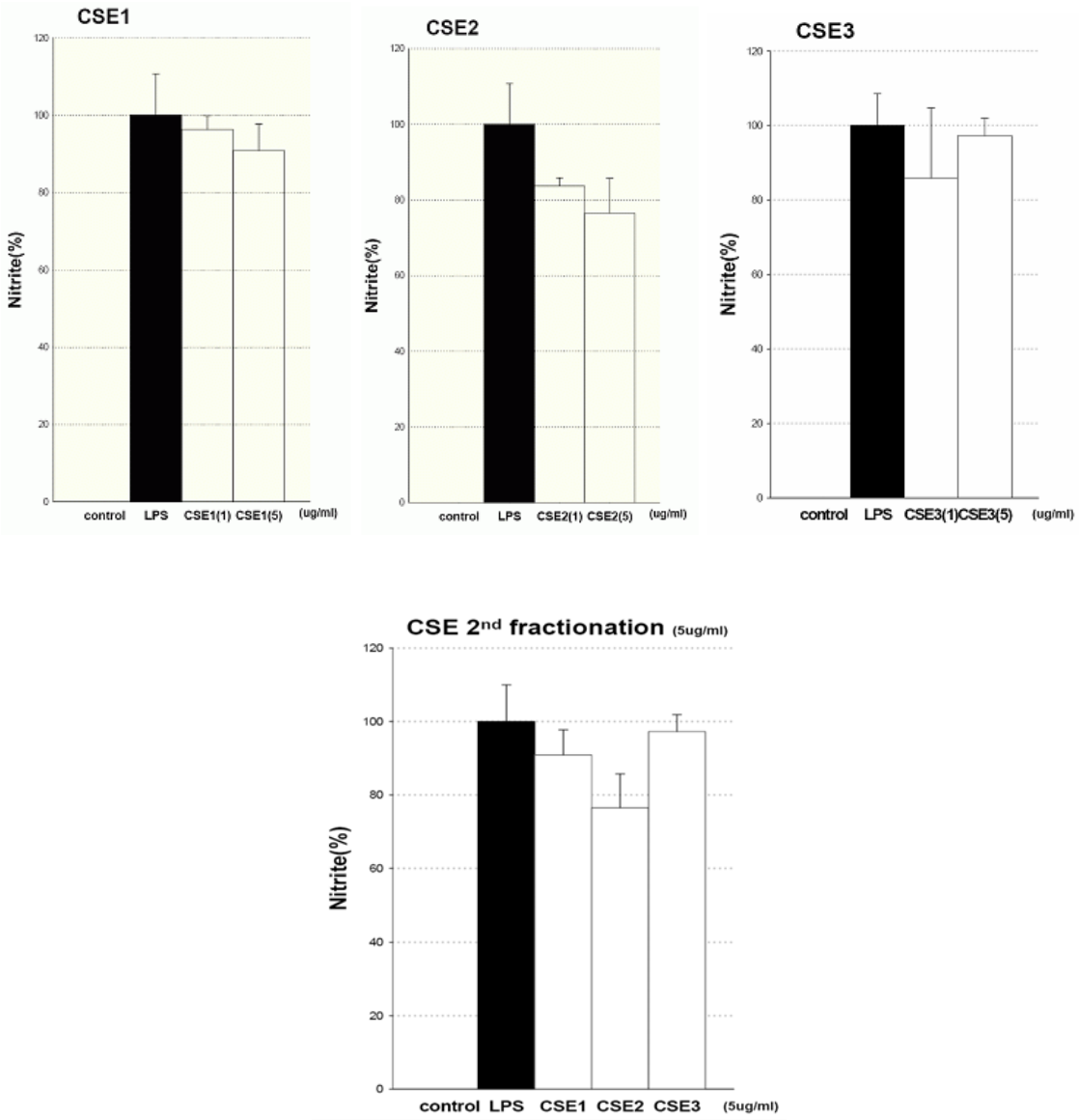


Fig. 35. EtOAc (CSE)의 소분획 추출물인 CSE1, CSE2가
각각 Raw 264.7 세포주에서 LPS 처리에 의한 NO 생산 증가에 미치는 영향

3) 녹차농축액 중에서 분리한 항염활성 성분의 항염활성 평가

녹차농축액 분획추출물 중 함유된 것으로 확인된 단일물질들에 대하여 이들 물질들의 항염활성을 각각 평가하였다 (Fig. 36, 37). 사용한 compound는 다음과 같다; compound 1 (catechin), compound 2 (epicatechin gallate; ECG). compound 3 (epigallocatechin gallate; EGCG), compound 4 (epicatechin; EC), compound 5 (epigallocatechin; EGC), compound 6 (gallic acid; GA).

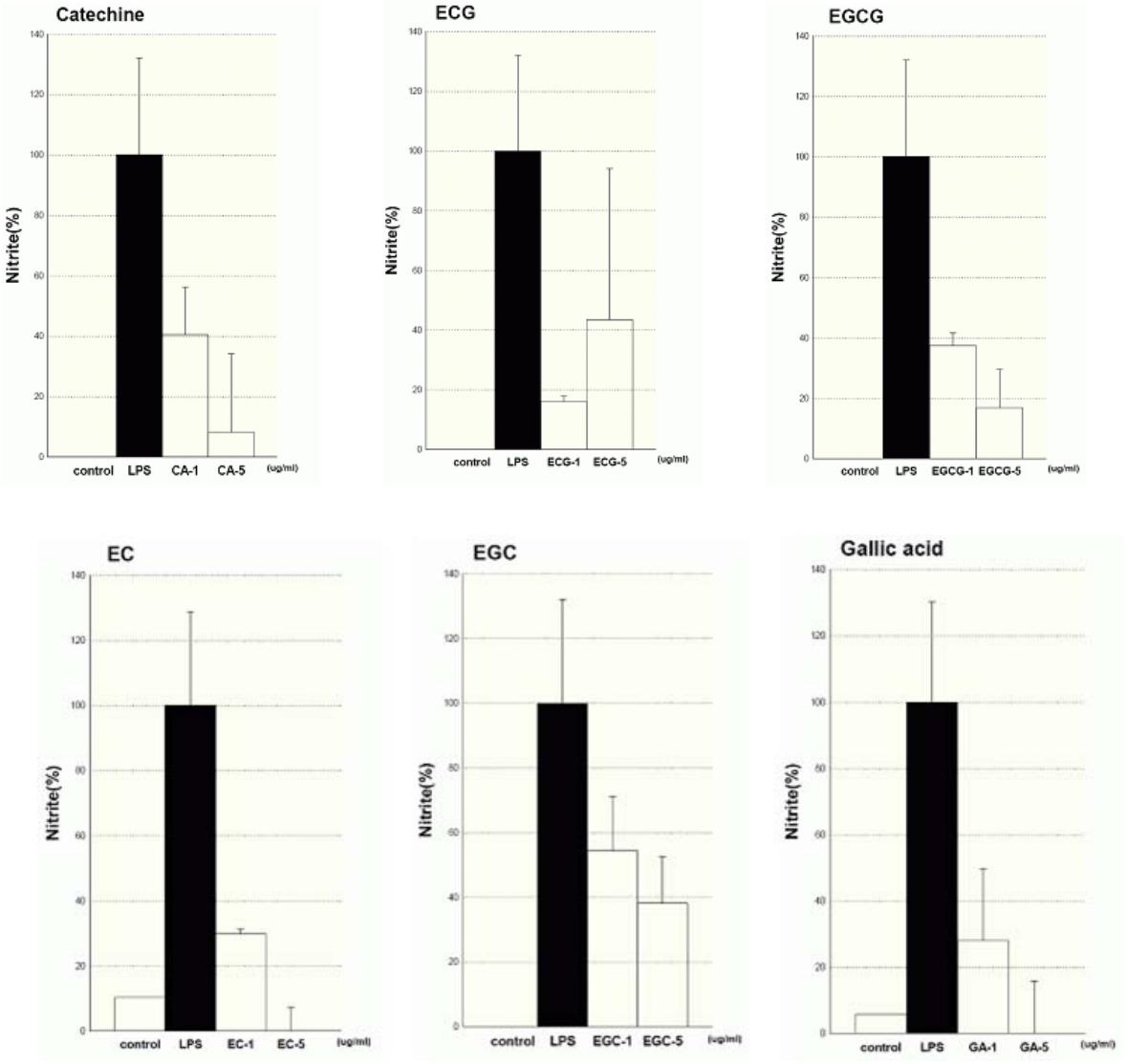


Fig. 36. 녹차 중 함유된 compound인 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid가 각각 Raw 264.7 세포주에서 LPS 처리에 의한 NO 생산 증가에 미치는 영향

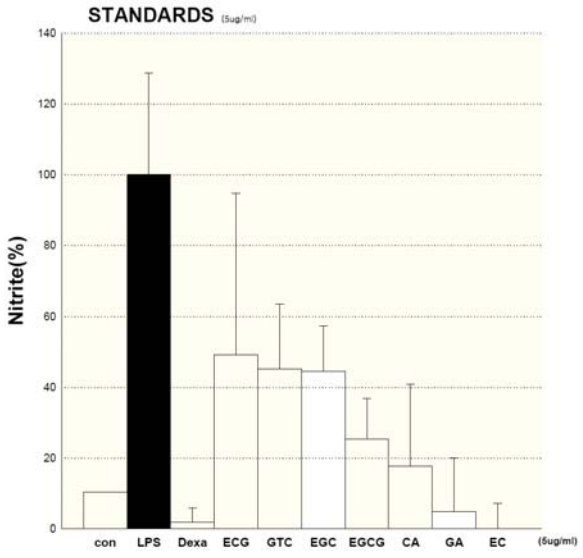


Fig. 37. 녹차 중 함유된 compound인 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid 각 5 μg/ml의 항염 효과 비교: Dexamehtasone (Dexa) 및 시판 green tea extract (GTC)와의 비교

7. 녹차추출물의 항염증 효과와 관련된 세포 내 약물작용 타겟 확인

앞의 실험으로부터 항염 활성을 가지는 녹차농축액의 항염 활성 매개 compound인 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid에 대하여 이들 물질의 항염 활성의 세포 내 약물작용 타겟을 확인하고 효과를 비교하기 위하여 ① inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) 단백 발현과 ② NF-kB 활성화에 미치는 영향을 각각 검토하였다. 각 분획시료가 각각의 지표에 미치는 영향은 다음과 같다 (Fig. 38).

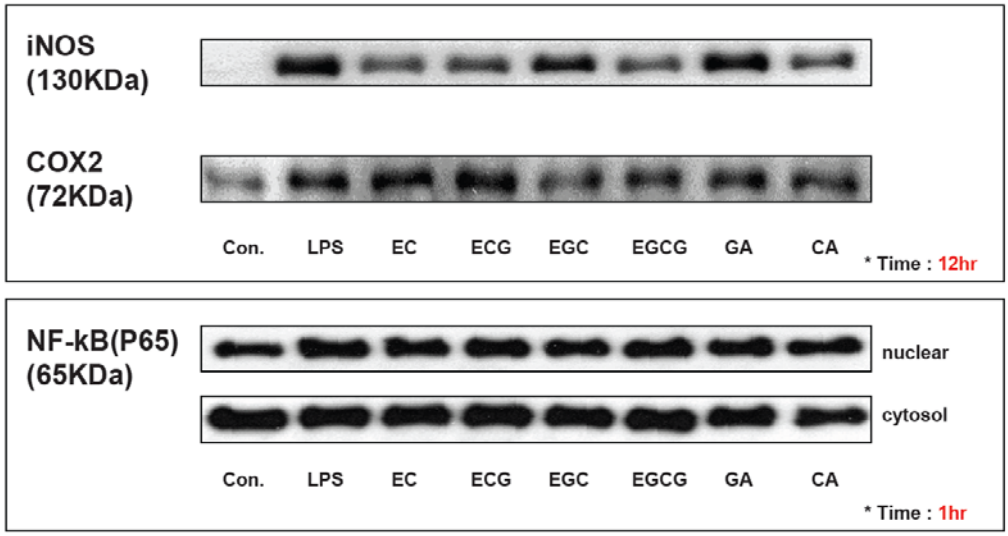


Fig. 38. 녹차농축액 항염 활성 compound catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid가 각각 Raw 264.7 세포주에서 LPS 처리에 의한 (A) iNOS 및 COX-2 단백 발현, (B) NF-kB 활성화에 미치는 영향

8. 녹차추출물의 항산화 활성 평가를 통한 염증반응에서의 세포보호 효과

염증반응 과정에서 생산이 급격히 증가되는 NO는 강력한 산화성 물질로 잘 알려져 있으며, 따라서 NO 생산의 증가는 세포에 대한 산화성 스트레스의 증가를 유도하여 세포에 이차적인 손상과 괴사를 초래하게 된다. 뿐만 아니라, COX-2 효소 역시 효소 활성 과정에서 산화성 스트레스가 유도됨이 보고된 바 있다. 이와 같은 산화성 스트레스는 직접적으로 세포손상과 연결되어 염증반응으로 인한 상처를 악화시키고 치유속도를 더디게 하는 주된 요인으로 작용하게 되므로 염증치료 과정에서 약물의 항염 효과와 함께 항산화 효과가 매우 중요한 의미를 갖는다. 따라서 본 과제에서 항염 효과가 우수한 것으로 확인된 각 녹차농축액 추출분획 및 항염 활성 표준성분의 항산화 활성을 평가하여 염증 반응으로부터의 세포보호효과를 검토하고자 하였다.

피부를 구성하는 세포 중 가장 비율이 높은 각질형성세포 (keratinocyte)를 배양하여 H_2O_2 또는 NO donor를 처리하여 산화성 스트레스 세포모델을 작성하였다. 세포손상의 평가는 세포 사멸시 세포막 손상으로 인해 세포 밖으로 유출되는 lactate dehydrogenase (LDH) 효소활성을 측

정함으로서 세포손상의 지표로 하였으며, 녹차농축액 분획 추출물 및 녹차농축액 분획으로부터 얻은 compound인 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid를 각각 처리하였을 때, 산화성 스트레스에 의한 세포손상의 정도에 미치는 영향을 확인하였다. Fig. 39의 결과에서 보이는 바와 같이, 녹차농축액 분획 추출물 및 6개 compound 모두 산화성 스트레스에 의한 세포사멸을 억제하는 효과를 보여 이들 분획이 항산화 효과를 가지고 있음을 의미한다.

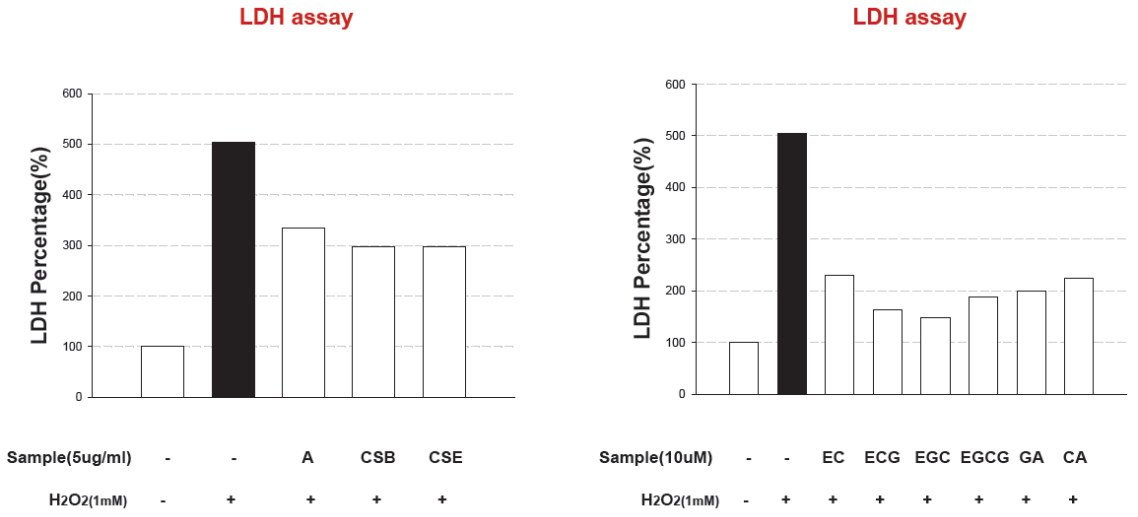


Fig. 39. 녹차농축액 분획 추출물 및 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid가 각각 keratinocyte에서 NO, H2O2 처리에 의한 세포손상에 미치는 영향

9. 피부 구성 세포에 대한 녹차추출물의 세포독성 여부 평가

녹차농축액 추출분획의 피부 적용을 위해서는 대상 시료가 피부 구성 세포에 대하여 특별한 독성을 나타내지 않아야 한다. 이를 검정하기 위하여 keratinocyte를 배양하여 녹차농축액 분획 추출물 및 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid가 각각 세포독성을 나타내는지를 LDH assay를 이용하여 평가하였다 (Fig. 40). 결과에서 알 수 있는 바와 같이 각 compound는 유의적인 항염 효과를 보였던 농도에서 (녹차 추출액 5 μg/ml 및 표준품 10 μM) 모두 피부 구성 세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않았다.

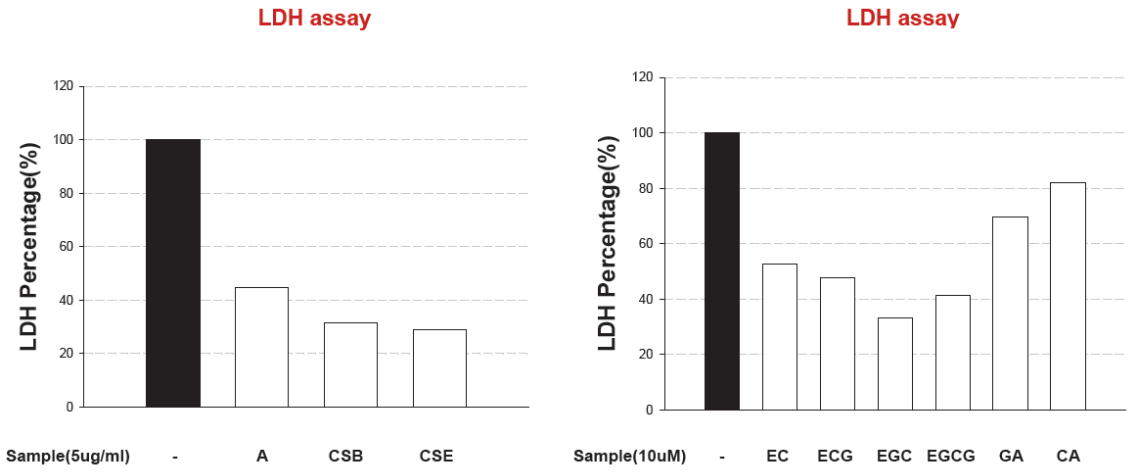


Fig. 40. 녹차농축액 분획 추출물 및 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid의 세포독성여부 평가

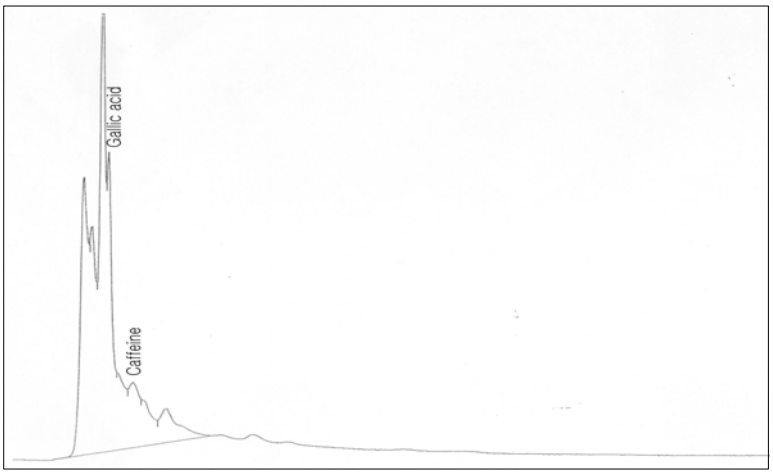
10. 녹차농축액 추출분획 중의 항염 활성 성분 함유량 정량

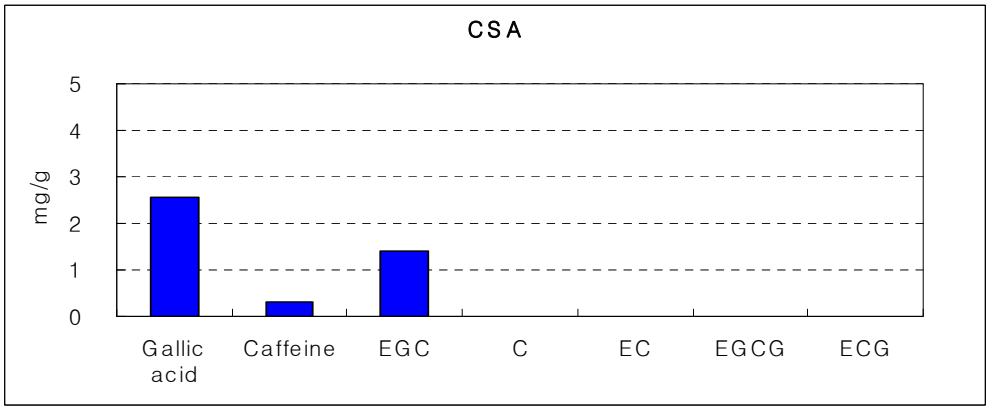
본 과제 수행 과정에서 항염 활성을 갖는 compound들을 분리하였고, 이들 물질이 염증반응 세포 모델에서 항염 효과를 가짐을 확인하였으므로, 녹차농축액의 각 분획 및 추출 단계에서 얻은 시료들 중 항염 활성 compound의 함량을 평가하여 향후 녹차농축액을 이용한 항염증 연고제 개발을 위한 기초 자료로 제시하고자 하였다.

1) 녹차농축액 일차 분획 중의 항염 활성 compound의 정량

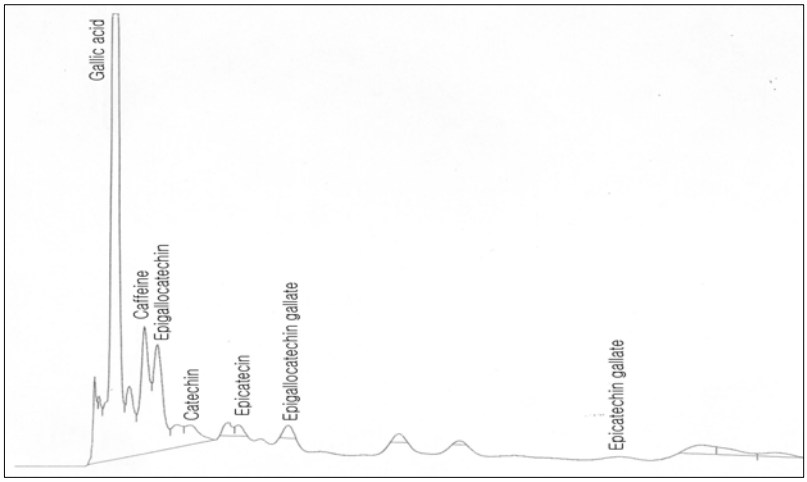
녹차농축액중의 유효 성분을 확인하기 위하여 농축액을 아래 5가지 용매, 물(CSA), 부탄올(CSB), 클로로포름(CSC), 에칠 아세테이트(CSE) 및 n-헥산(CSH)를 사용하여 추출한 후 각 추출액 중 유효성분의 함량을 분석하였다. 그 결과 부탄올(CSB)과 에칠 아세테이트(CSE) 층에서 주로 항염증 효과를 나타내는 catechin유도체들이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 특히 클로로포름 및 n-헥산층에는 caffeine이 주로 함유되어 있음을 확인하였다.

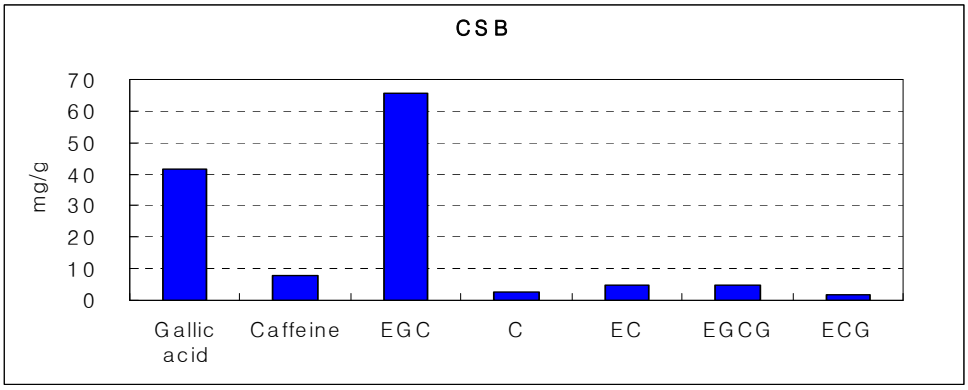
CSA(물)


Gallic acid
Caffeine

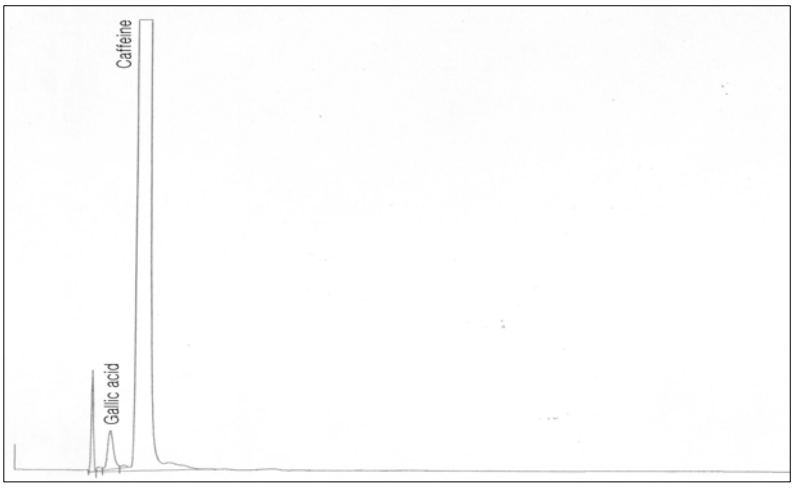

CSA
mg/g
5
4
3
2
1
0
Gallic acid
Caffeine
EGC
C
EC
EGCG
ECG

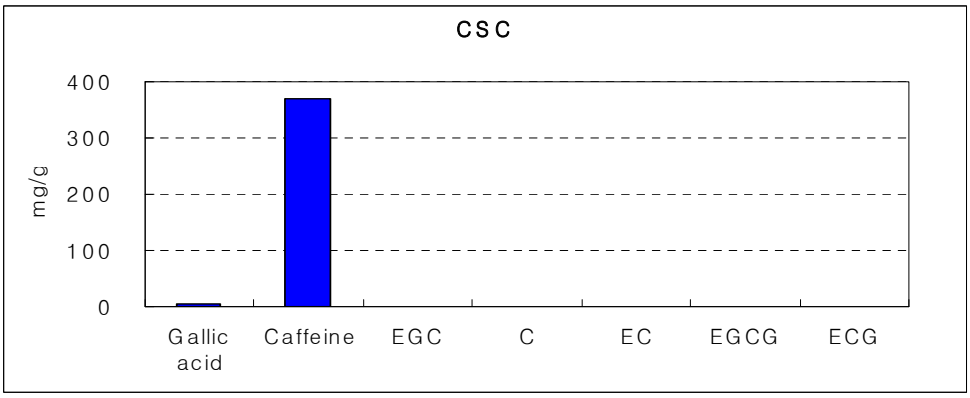
CSB(부탄올)


Gallic acid
Caffeine
Epigallocatechin
Catechin
Epicatecin
Epigallocatechin gallate
Epicatechin gallate

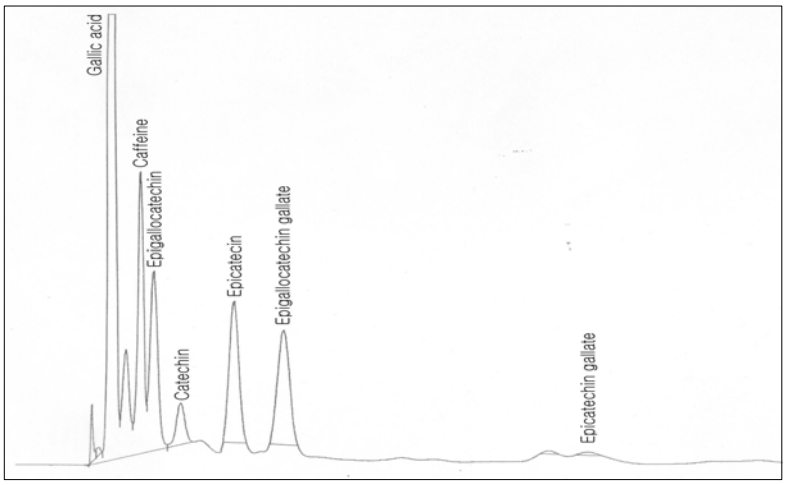


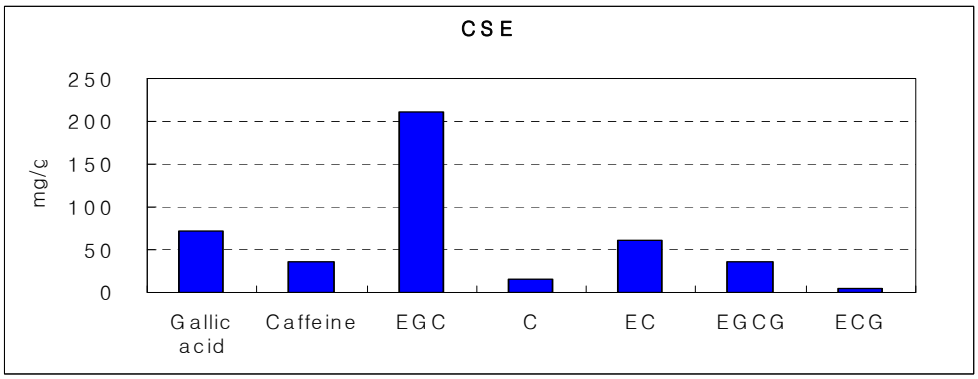
CSC(클로로포름)



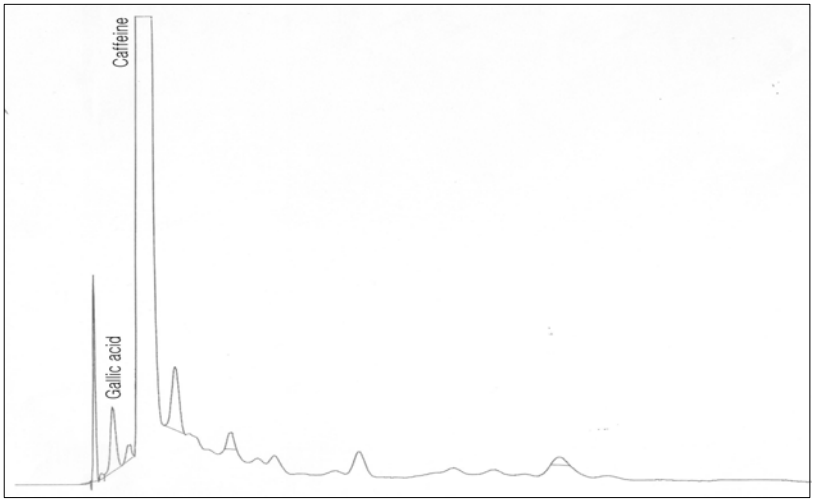


CSE(에칠 아세테이트)


Gallic acid
Caffeine
Epigallocatechin
Catechin
Epicatecin
Epigallocatechin gallate
Epicatechin gallate


CSE
250
200
150
100
50
0
mg/g
Gallic acid
Caffeine
EGC
C
EC
EGCG
ECG

CSH(n-헥산)


Caffeine
Gallic acid

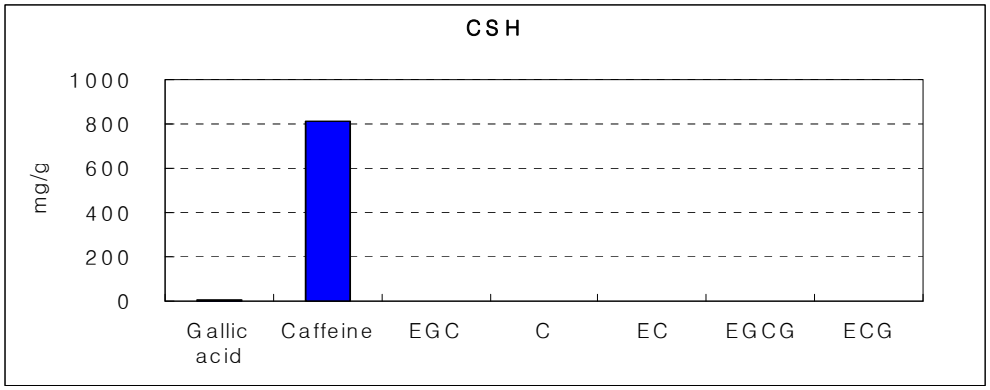


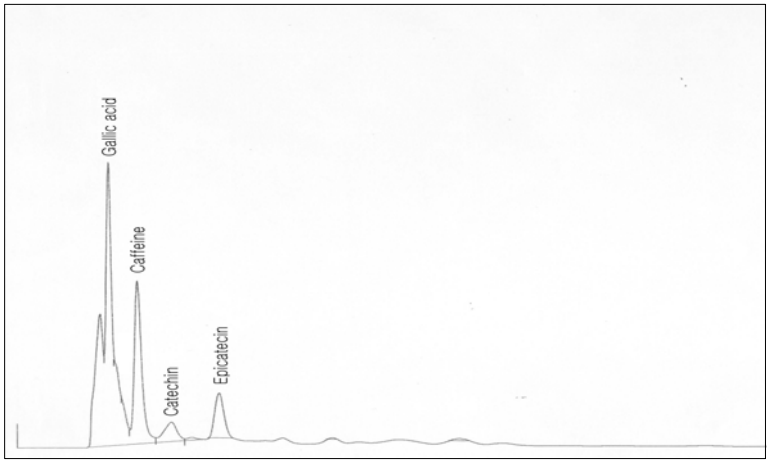
Fig. 41. 녹차농축액 일차 분획 중의 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid 및 caffeine 성분 정량

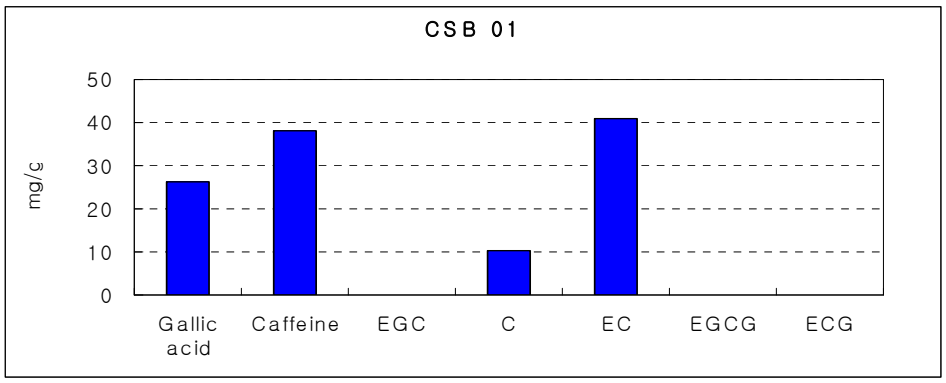
2) 녹차농축액 이차 분획 중의 항염 활성 compound의 정량

① CSB 분획에 대한 이차 분획

CSB 분획에 대한 이차 분획중의 유효 성분을 확인하기 위하여 각 분액 중 유효성분의 함량을 분석하였다. 그 결과 CSB01 분액에서 주로 gallic acid, caffeine, catechin(C), 및 epicatechin (EC) 유도체들이 함유되어 있음을 알 수 있었으며 CSB02에는 다량의 gallic acid 및 소량의 epigallocatechin (EGC), caffeine이 함유되어 있었고 CSB03에는 gallic acid 및 epigallocatechin gallate (EGCG)만 함유되어 있음을 확인하였다.

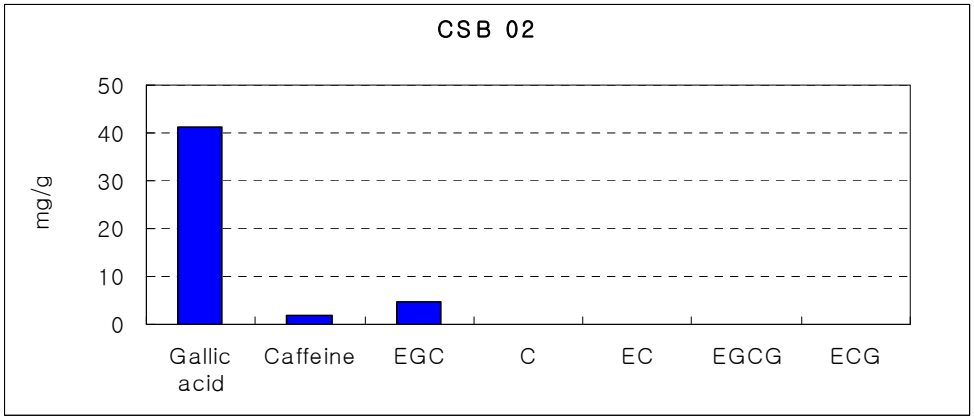
CSB01




CSB 01
mg/g
50
40
30
20
10
0
Gallic acid
Caffeine
EGC
C
EC
EGCG
ECG

CSB02

Gallic acid
Caffeine
Epigallocatechin


CSB 02
mg/g
50
40
30
20
10
0
Gallic acid
Caffeine
EGC
C
EC
EGCG
ECG

CSB03

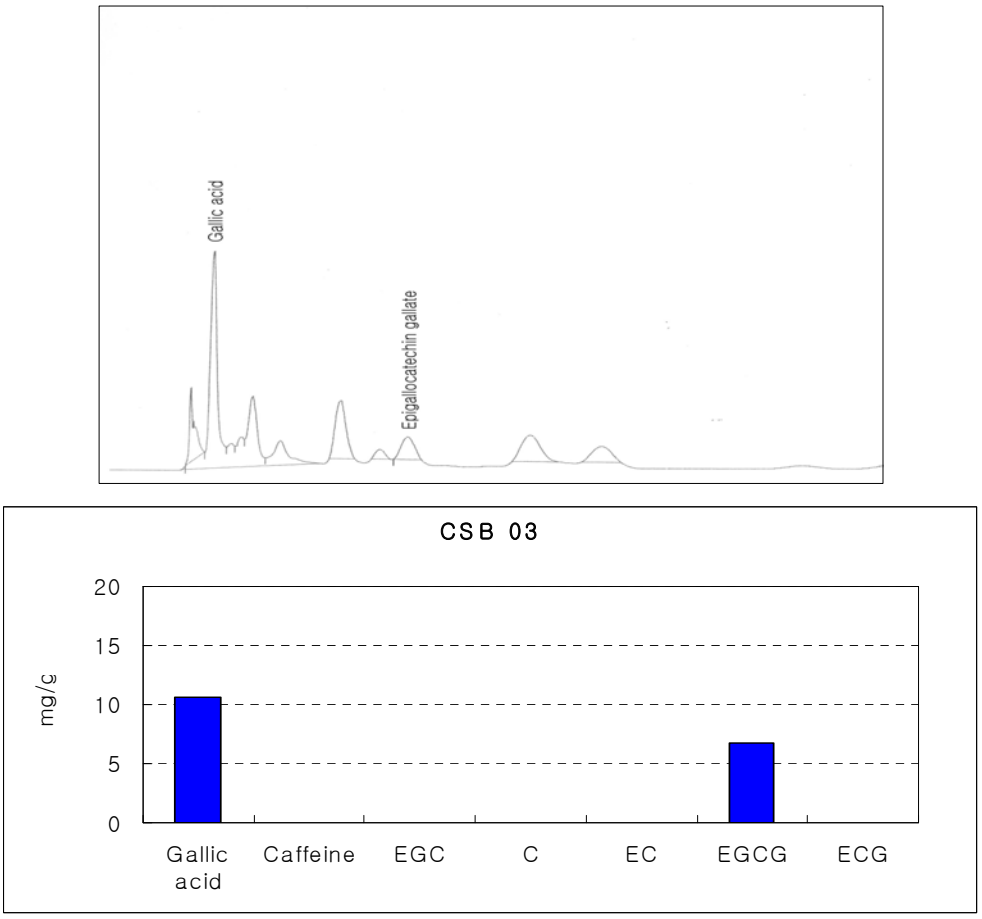
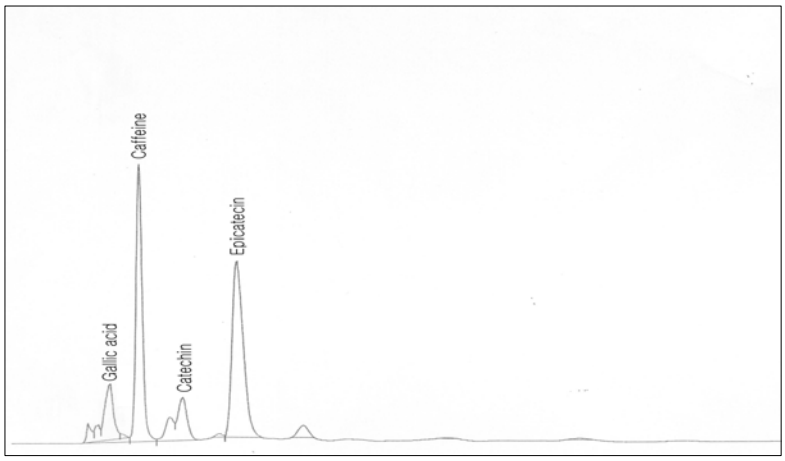


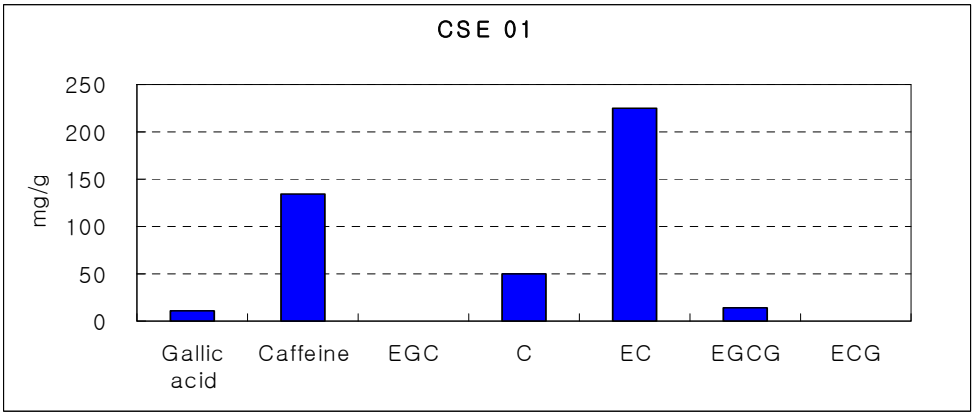
Fig. 42. 녹차농축액 CSB 분획에서 얻은 이2차 분획 중의 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid 및 caffeine 성분 정량

② CSE 분획에 대한 이차 분획

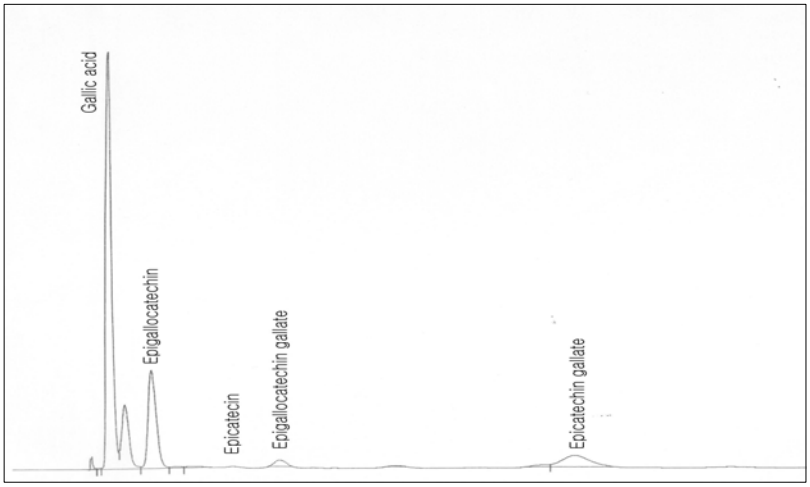
CSE 분획에 대한 이차 분획중의 유효성분의 함량을 분석하였다. 그 결과 CSE01 분액에서 주로 caffeine 및 epicatechin (EC)이 함유되어 있었고 소량의 gallic acid 및 catechin(C)이 함유되어 있음을 알 수 있었으며 CSE02에는 다량의 epigallocatechin (EGC)만 함유되어 있었고 CSE03에는 gallic acid, epigallocatechin (EGC) 및 epigallocatechin gallate (EGCG)를 주로 함유하고 있음을 확인하였다.

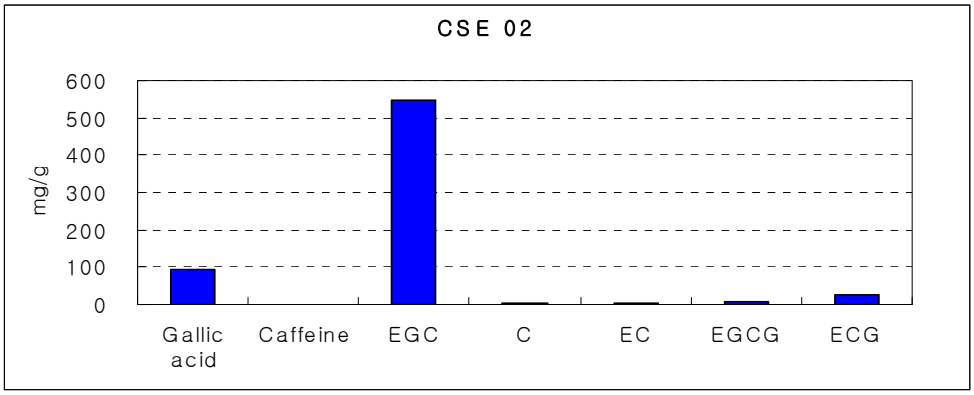
CSE01


Caffeine
Epicatechin
Gallic acid
Catechin

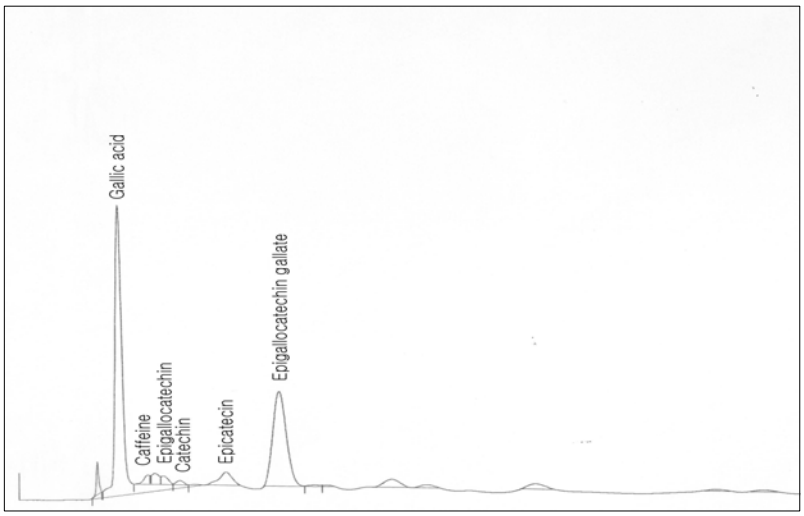

CSE 01
250
200
150
100
50
0
mg/g
Gallic acid
Caffeine
EGC
C
EC
EGCG
ECG

CSE02


Gallic acid
Epigallocatechin
Epicatechin
Epigallocatechin gallate
Epicatechin gallate



CSE03



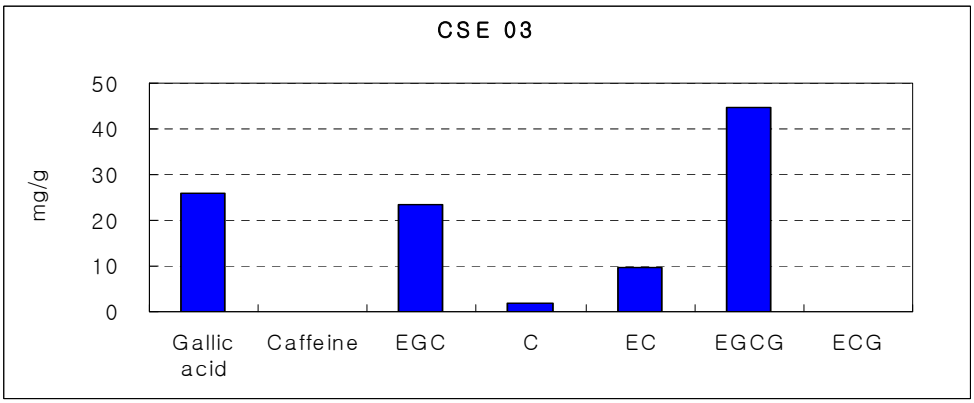
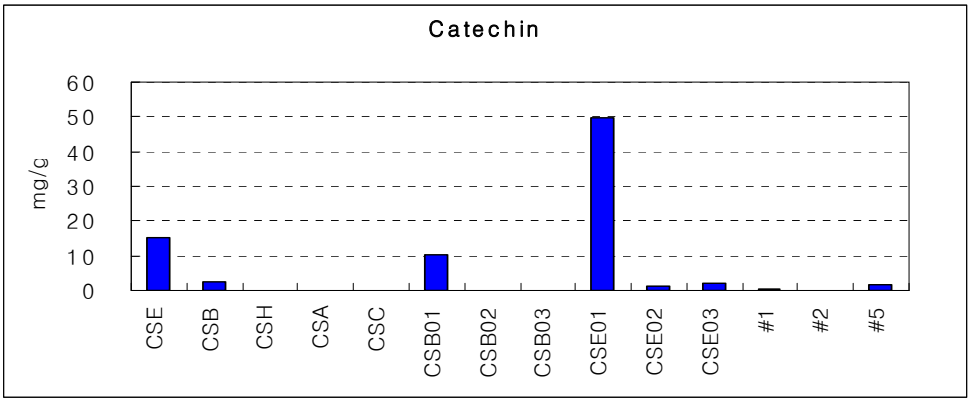
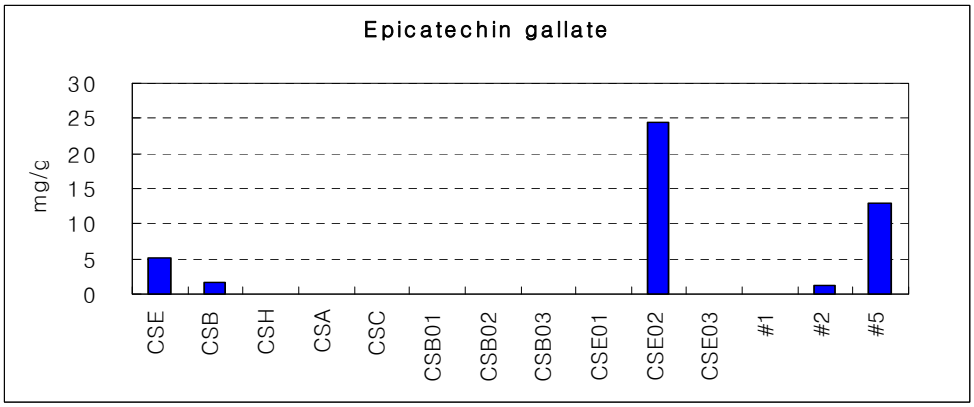


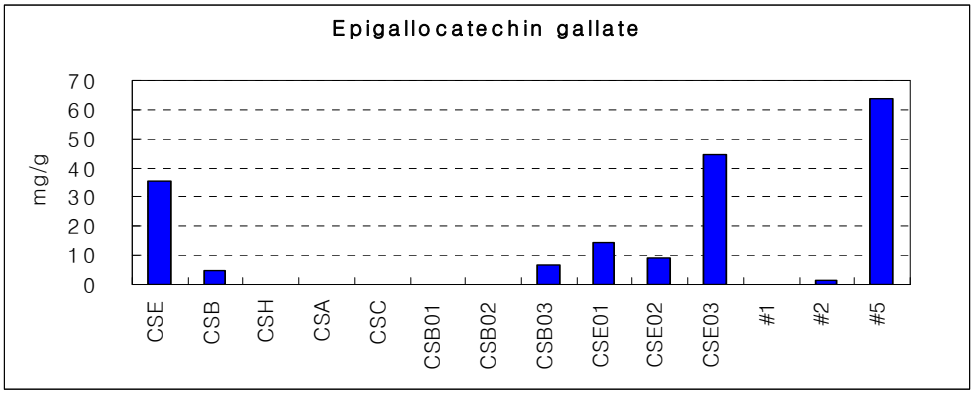
Fig. 43. 녹차농축액 CSE 분획에서 얻은 이차 분획 중의 catechin, epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), gallic acid 및 caffeine 성분 정량

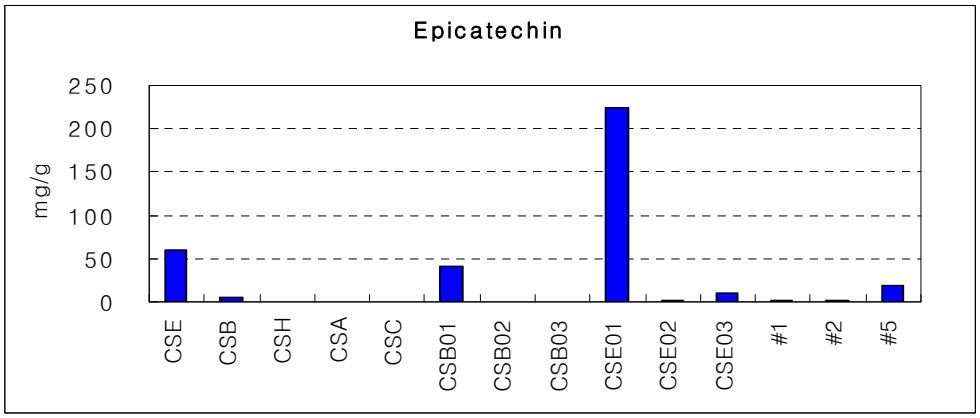
3) Compound 종류에 따른 각 녹차농축액 분획 중 함유량 비교

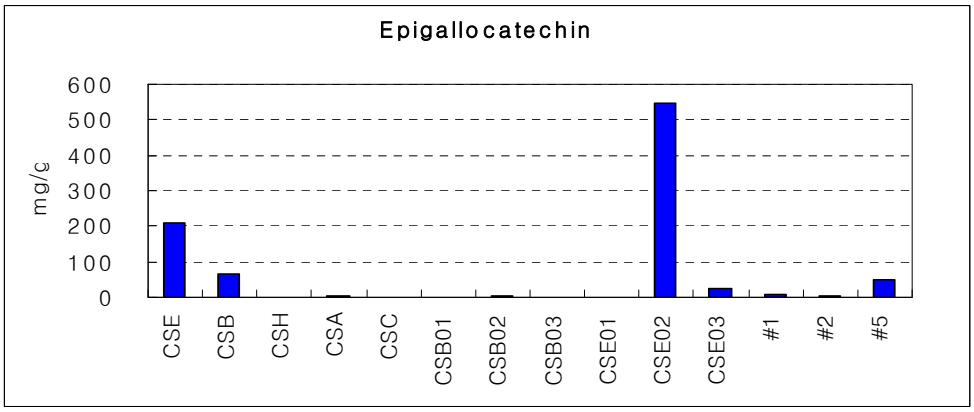
다음은 각 녹차농축액 분획 중 주요 Compound 함유량을 비교한 것이다. 농축액을 아래 5가지 용매, 물(CSA), 부탄올(CSB), 클로로포름(CSC), 에칠 아세테이트(CSE) 및 n-헥산(CSH)을 사용하여 추출한 후 그 중 유효 성분이 많이 함유된 부탄올(CSB)과 에칠 아세테이트(CSE)층을 다시 각각 3개씩 sub분획하여 CSB 01, 02, 03과 CSE 01, 02, 03으로 분획하여 각각의 분획에서의 catechin 유도체들의 함량을 비교하였다. 특히 녹차 처리 과정에서의 차이에 따른 유효성분의 변화를 확인하기 위하여 #1, #2, #5의 녹차 추출액을 분석 비교하였다. #1은 녹차잎을 고온에서 수분간 열처리한 후 물로 추출한 녹차 농축액이며, #2는 #1의 열처리를 생략하고 물로 추출한 녹차 농축액이다. #5는 녹차 농축액 #1을 급속 냉각하여 얼음 결정을 제거하고 녹차 성분만 추출하는 방식으로 제조한 분말을 메탄올에 희석시킨 시료이다.

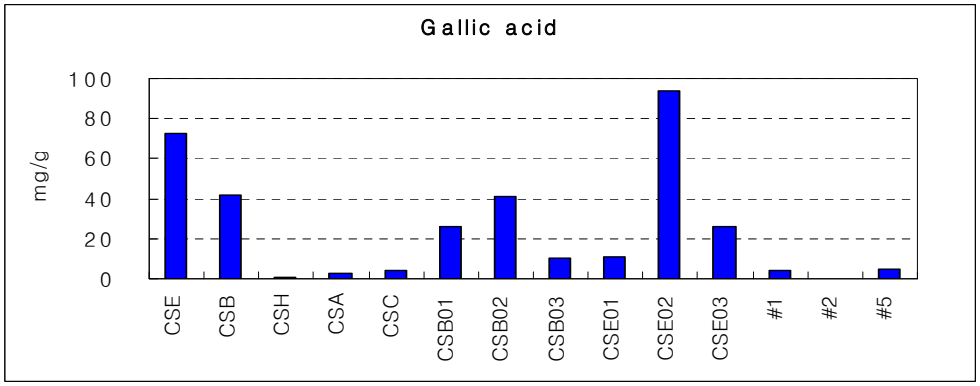





Epigallocatechin gallate
mg/g
70
60
50
40
30
20
10
0
CSE
CSB
CSH
CSA
CSC
CSB01
CSB02
CSB03
CSE01
CSE02
CSE03
#1
#2
#5


Epicatechin
mg/g
250
200
150
100
50
0
CSE
CSB
CSH
CSA
CSC
CSB01
CSB02
CSB03
CSE01
CSE02
CSE03
#1
#2
#5


Epigallocatechin
mg/g
600
500
400
300
200
100
0
CSE
CSB
CSH
CSA
CSC
CSB01
CSB02
CSB03
CSE01
CSE02
CSE03
#1
#2
#5


Gallic acid
mg/g
100
80
60
40
20
0
CSE
CSB
CSH
CSA
CSC
CSB01
CSB02
CSB03
CSE01
CSE02
CSE03
#1
#2
#5

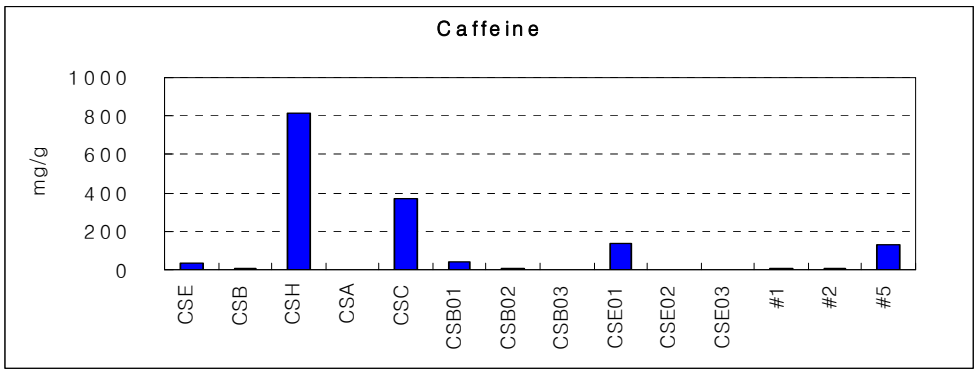


Fig. 44. 녹차농축분액 중에서 분리된 항염 활성 compound 함유량 비교

Table 4. 녹차농축액 시료 중의 항염 활성 compound 정량

sample / standard	녹차농축액 (mg/mL)	CSB (mg/g)	CSE (mg/g)	CSH (mg/g)	CSA (mg/g)	CSC (mg/g)	CSB01 (mg/g)	CSB02 (mg/g)
Gallic acid	1.06	41.48	72.51	0.73	2.55	4.02	26.10	41.10
Caffeine	5.31	7.88	36.33	815.3	0.30	369.5	38.05	1.98
Epigallocatechin	1.82	65.43	210.9	-	1.40	-	-	4.60
Catechin	0.31	2.43	15.38	-	-	-	10.42	-
Epicatechin	0.86	4.65	60.63	-	-	-	40.81	-
Epigallocatechin gallate	0.76	4.91	35.65	-	-	-	-	-
Epicatechin gallate	0.21	1.62	5.12	-	-	-	-	-

sample / standard	CSB03 (mg/g)	CSE01 (mg/g)	CSE02 (mg/g)	CSE03 (mg/g)	#1 (mg/mL)	#2 (mg/mL)	#5 (mg/g)
Gallic acid	10.60	10.72	93.62	25.82	3.98	0.27	4.87
Caffeine	-	134.2	-	-	9.15	3.18	130.0
Epigallocatechin	-	-	548.5	23.51	6.20	2.53	48.91
Catechin	-	49.86	1.09	1.88	0.21	0.09	1.49
Epicatechin	-	225.1	2.40	9.77	1.89	0.75	18.01

Epigallocatechin gallate	6.74	14.17	9.23	44.55	-	1.39	63.85
Epicatechin gallate	-	-	24.54	-	-	1.18	12.98

sample / standard	녹차농축액 (μmole/mL)	CSB (μmole/g)	CSE (μmole/g)	CSH (μmole/g)	CSA (μmole/g)	CSC (μmole/g)	CSB01 (μmole/g)	CSB02 (μmole/g)
Gallic acid	6	244	426	4	15	24	153	242
Caffeine	27	41	187	4198	2	1903	196	26
Epigallocatechin	6	214	689	-	10	-	-	15
Catechin	1	8	53	-	-	-	36	-
Epicatechin	3	16	209	-	-	-	141	-
Epigallocatechin gallate	2	11	78	-	-	-	-	-
Epicatechin gallate	0.48	4	12	-	-	-	-	-

sample / standard	CSB03 (μmole/g)	CSE01 (μmole/g)	CSE02 (μmole/g)	CSE03 (μmole/g)	#1 (μmole/mL)	#2 (μmole/mL)	#5 (μmole/g)
Gallic acid	62	63	550	152	23	2	29
Caffeine	-	691	-	-	47	26	670
Epigallocatechin	-	-	1791	77	20	8	160
Catechin	-	172	4	6	1	0.34	5
Epicatechin	-	776	8	34	7	7	62
Epigallocatechin gallate	15	31	20	97	-	3	139
Epicatechin gallate	-	-	55	-	-	3	29

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가. 목표달성도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위	달성도(%)
1차 년도	2006	1) 녹차추출물의 유효 생리활성 물질의 정량법 확립 및 상품의 표준화	녹차 추출물의 유효 생리활성 지표 물질 선정 및 함량 분석을 통한 기준 및 시험방법 설정	- 보성 녹차 추출물 분석에 적당한 분석법을 선정 적용하여 test 함으로써 향후 quality control에 유용한 정량법 확립	100
				- 유효 지표 물질을 설정하여 그 정량성을 확립함으로써 상품의 표준화에 이용	100
		2) 녹차추출물 유래의 항염증 활성 성분 분리	항염증 효과를 극대화하기 위한 분획 추출방법의 적정조건 확립 및 유효성분의 동정	- 녹차추출물의 유효성분을 추출하여 녹차 표준엑스를 제조	100
				- 항염증 및 항산화 활성이 인정되는 녹차 표준엑스로부터 생리활성 분획 제조	100
				- 생리활성 분획으로부터 생리활성소분획 제조	100
				- 활성 소분획으로부터 항염증 항산화 성분 분리 및 정제	100
				- 분리된 활성 성분의 화학구조 규명	100
		3) 항염증 관련 생리활성의 평가와 기전 규명을 통한 약리학적 검증	'보성녹차농축앰플'에서의 항염증 효과를 중심으로 한 생리활성의 평가와 기전 규명	- 녹차추출물 및 분획 성분이 면역세포에서의 염증반응 매개물질 생산과 관련 신호전달기전에 미치는 영향 평가를 통한 항염증 효과 검토	100
				- 항산화 활성 평가를 통한 염증반응에서의 세포보호 효과 연구	100
				- 피부 구성 주된 세포인 keratinocyte에 대한 독성시험을 통해 연고제로의 개발시 피부독성 유발 가능성 평가	100

1. 녹차의 항염 생리활성 성분의 분석법 확립

녹차추출물의 유효 항염 생리활성 물질의 정량법 확립을 통하여 시험방법 설정과 상품 표준화를 확립할 수 있다. 녹차추출물의 유효 생리활성 물질인 gallic acid, epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate의 동시 정량을 HPLC 방법으로 확립하였다. 분석 기술적으로 유사 화합물의 동시 정량을 위해서는 대부분의 경우 gradient mobile phase program이 주된 방법으로 현재 6종의 분석법이 발표되어 있으나 본 연구에서는 단일 혼합 mobile phase를 사용하는 isocratic method를 이용하여 30분 내에 녹차에 다량 함유되어 있는 caffeine 까지 분석이 동시에 이루어질 수 있다는 점에서 분석 방법상의 큰 개선이 이루어졌음을 의미한다.

2. 녹차농축액의 생리활성 성분 정량

녹차농축액을 5가지 용매, 물(CSA), 부탄올(CSB), 클로로포름(CSC), 에칠 아세테이트(CSE) 및 n-헥산(CSH)를 사용하여 추출한 결과 부탄올(CSB)과 에칠 아세테이트(CSE)층에서 주로 항염증 효과를 나타내는 catechin 유도체들이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 특히 비극성 용매인 클로로포름 및 n-헥산층에는 caffeine이 주로 함유되어 있음을 확인하였다. 이는 향후 녹차의 항염 유효 성분 추출시 부탄올(CSB)과 에칠 아세테이트(CSE)를 사용하여 간편하게 유효성분을 추출할 수 있음을 확인하는 것이며 특히 decaffeination이 필요한 경우 비극성 용매를 사용할 수 있음을 보여준다.

3. 녹차추출농축액으로부터의 caffeine 제거방법 확립

목재 가공시 발생되는 부산물인 톱밥으로부터 얻어진 lignocellulose를 충전제로 사용하여 만든 column을 통해 green tea extract로부터 caffeine이 제거된 green tea polyphenol을 얻어 낼 수 있는 방법을 확립하였다. Gallate residues를 가진 green tea polyphenol, 즉 EGCG나 ECG 등은 증류수를 이동상으로 사용하여 용출하였을 때에 lignocellulose column의 고정상에 흡착되는 반면에 카페인은 컬럼을 통과하였다. 흡착된 polyphenols은 60% ethanol을 흘려주었을 때 가장 많은 양이 녹아 나왔으며 컬럼 전 caffeine/EGCG 비율이 0.696이고 컬럼 후 caffeine/EGCG 비율은 0.004로 떨어졌다. 이 방법은 이동상으로서 증류수와 에탄올을 사용함으로써, 기존의 방법에서 흔히 사용되던 methylene chloride 등 독성 용매 사용으로 인한 부작용의 우려 없이 고효율의 decaffeinated green tea polyphenol 농축액을 얻을 수 있는 방법을 확립하였다.

4. 추출 및 분획을 통한 녹차(*Camellia sinensis*)에서의 항염 활성물질 분리

녹차추출농축액 시료에 대하여 각종 유기용매(hexane, chloroform, EtOAc, BuOH)를 이용한 분배(partition) 과정을 통하여 표준추출물을 제조하였다. 이들에 대한 생리활성 평가결과로부터 항

염활성이 인정되는 분획에 대하여 Silica gel, Sephadex LH20, 또는 역상 TLC, CC, MPLC, HPLC 등을 사용한 각종 크로마토그래피를 통해 소분획을 제조하고, 이 과정을 반복함으로써 항염증 활성을 나타내는 6종의 물질을 분리, 정제하였다.

5. 항염 활성 성분의 화학구조의결정

녹차추출농축액으로부터 얻어진 순수물질에 대하여 NMR (^{1}H과 ^{13}C) 및 UV, IR 및 MS 등 각종 spectroscopy 측정 데이터를 분석하여, catechin, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, epigallocatechin gallate 및 gallic acid 등 총 6종의 항염증 생리활성 성분들에 대한 화학구조를 동정, 확인하였다.

6. 녹차농축액 분획추출물의 항염 활성 평가

시판 녹차농축액으로부터 고부가가치 상품인 항염증 연고제로의 개발을 위하여 항염 활성을 증강시킬 수 있는 분획추출방법을 제시하고자 녹차농축액을 5가지 용매, 물(CSA), 부탄올(CSB), 클로로포름(CSC), 에칠 아세테이트(CSE) 및 n-헥산(CSH)을 사용하여 추출하여 각각의 항염 활성을 확인하였다. 본 과제의 수행결과에 의하면 부탄올(CSB)과 에칠 아세테이트(CSE)를 이용한 용매 추출시 항염 활성이 가장 증가함을 알 수 있었으며, 이는 본 과제의 제 1 세부과제에서 이 분획에서 가장 항염 유효 성분을 많이 함유하고 있다는 결과와 함께 향후 항염 활성 증대를 위한 분획추출법으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

7. 녹차추출물의 항염증 효과와 관련된 세포 내 약물작용 타겟 확인

녹차 농축추출분획 및 항염 활성 성분의 약물 작용 타겟으로 iNOS 및 COX-2 효소 단백 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 일반적으로 iNOS 및 COX-2는 항염 작용의 주요 타겟이 되므로 이들 단백 발현에 미치는 영향은 약물의 작용기전을 확인하는 데에 매우 중요한 의미를 가지게 된다. 본 과제 수행 결과, 녹차 추출물의 항염 활성을 나타내는 유효 성분 중 EC, EGC, EGCG 및 catechine은 LPS에 의한 iNOS 발현증가를 억제하는 효과가 크게 나타났으며, EGC, EGCG, catechine, gallic acid는 COX-2 발현에 대한 영향을 효과적으로 차단하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 항염증 연고제 개발에 있어 단일물질보다는 천연물 중 함유된 다양한 성분을 동시에 적용함으로서 약물 작용의 다양성을 통하여 약물 효과를 증강시킬 수 있음을 시사하였다.

8. 녹차추출물의 항산화 활성 평가를 통한 염증반응에서의 세포보호 효과

녹차 추출물이 가지고 있는 항염증 효과 뿐 아니라 항산화 효과는 항염증 연고제로의 적용시 염증의 직접적인 억제 뿐 아니라 염증 과정에 수반되는 세포 손상을 억제하는 효과를 가질 수 있음을 의미한다. 따라서 녹차 추출물의 항염 및 항산화 효과는 기존에 단순히 항염 활성만을 가지는 성분에 비하여 효과적으로 염증 증상 개선을 기대할 수 있음을 의미한다.

9. 녹차농축액 추출분획 중의 항염 활성 성분 함유량 정량

1) CSE 분획에 대한 2차 분획

CSE 분획에 대한 2차 분획중의 유효성분의 함량을 분석 하였다. 그 결과 CSE01분액 에서 주로 caffeine 및 epicatechin (EC)이 함유되어 있었고 소량의 gallic acid 및 catechin(C)이 함유되어 있음을 알수 있었으며 CSE02에는 다량의 epigallocatechin (EGC)을 함유 하고 있었고 CSE03에는 gallic acid, epigallocatechin (EGC) 및 epigallocatechin gallate (EGCG)를 주로 함유 하고 있음을 확인하였다.

2) CSB 분획에 대한 2차 분획

CSB 분획에 대한 2차 분획중의 유효성분의 함량을 분석하였다. 그 결과 CSB01 분액에서 주로 gallic acid, caffeine, catechin(C), 및 epicatechin (EC) 유도체들이 함유되어 있음을 알 수 있었으며 CSB02에는 다량의 gallic acid 및 소량의 epigallocatechin (EGC), caffeine이 함유되어 있었고 CSB03에는 gallic acid 및 epigallocatechin gallate (EGCG)만 함유되어 있음을 확인하였다.

나. 관련분야 기여도

1) 기술적 측면

- 녹차 항염 성분 분석을 위한 조작이 간편한 새로운 HPLC isocratic method를 개발하여 30분 내에 동시 정량할 수 있는 분석법을 확립
- 상품의 균질성 확보
- 효능에 대한 과학적인 근거 제공
- 제조 공정 개선을 통한 상품의 질 개선
- 차세대 고부가가치 기능성 상품 개발을 위한 기초 자료 제시: 녹차추출물을 이용하여 아토피성 피부염, 지루성 피부염, 여드름 등 다양한 형태의 염증성 질환에 선택적인 연고/크림/로션/기능성 샴푸 등 개발의 기반 마련

2) 경제적·산업적 측면

- 포화 상태의 녹차 관련 상품 판매 증대
- 녹차 원료 수요 증가에 따른 녹차 재배 필요성 확대
- 녹차추출물을 이용한 의약품 개발 및 특허를 통한 지적 재산권의 우위 확보

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 추가연구의 필요성

- 본 연구결과를 기반으로 하여 연고제로의 상품 개발을 위한 후속연구가 필요함.

나. 타 연구에의 응용

- 이미 상품화된 녹차 추출물의 유효성분 함량을 정량화/표준화함으로써 기준 및 시험방법을 설정하고 상품의 균질성을 확보
- 유효 생물활성 물질의 함량을 분석 규명함으로써, 가공제품들의 효능에 대한 과학적인 근거 제공
- 향후 개발되는 각종 녹차 제품들의 건강 기능성식품 품목허가 신청시 필수적으로 요구되는 함량 표시 및 효능 표시의 근거자료로 활용
- 녹차 재료의 사용 종자, 채취 시기, 또는 재료의 가공처리 방법에 따른 유효 성분 함량을 모니터링 함으로써 상품의 질 개선

다. 기업화 추진 방안

- 녹차의 전반적 생리활성 물질을 체계적이고 광범위하게 분석하여 그 응용성을 개척하며, 이를 이용하여 새로운 녹차 관련 기능성 상품 개발
- 녹차추출물의항염증 효과 검증을 통한 항염증 연고제 개발의 기초자료 제공, 연고제의 상품화 연구로 연계

제 6 장 참고문헌

Ahmed, S.; Pakozdi, A.; Koch, A. E. Regulation of interleukin-1β-induced chemokine production and matrix metalloproteinase 2 activation by epigallocatechin-3-gallate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism* (2006), 54(8), 2393-2401.

Ahmed, S.; Wang, N.; Lalonde, M.; Goldberg, V. M.; Haqqi, M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1b-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2004), 308(2), 767-773.

Anderson, J. C.; Headley, C.; Stapleton, P. D.; Taylor, P. W. Synthesis and antibacterial activity of hydrolytically stable (-)-epicatechin gallate analogues for the modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2005), 15(10), 2633-2635.

Bae, Y.-I.; Jeong, C. H.; Shim, K. H. Antioxidative and antimicrobial activity of epicatechin isolated from leaves of loquat (*Eriobotrya japonica*). *J. Food Sci. Nutr.* (2005), 10(2), 118-121.

Bailey, D. T..; Yuhasz, Ralph, L.; Zheng, B. Method for isolation of caffeine-free catechins from green tea. U.S. Patent 6210679 (2001), 11 pp.

Barakat, H. H.; Hussein, S. A. M.; Marzouk, M. S.; Merfort, I.; Linscheid, M.; Nawwar, M. A. M. Polyphenolic metabolites of *Epilobium hirsutum*. *Phytochemistry* (1997), 46(5), 935-941.

Baranowski, R.; Kabut, J.; Baranowska, I. Analysis of Mixture of Catechins, Flavones, Flvanones, Flavonols, and Anthocyanidins by RP-HPLC. *Analytical Lett.* (2004), 37(1), 157-165.

Beno-Moualem, D.; Vinokur, Y.; Prusky, D. Cytokinins increase epicatechin content and fungal decay resistance in avocado fruits. *J. Plant Growth Regulation* (2001), 20(1), 95-100.

Blahová, E.; Brandšteterová, E.; Fabulová, A. Isolation and Determination of Phenolic Compounds in Fruit-Green Tea. *J. Liquid Chrom. & Related Tech.* (2004), 27(1), 31-48.

Chattopadhyay, P.; Besra, S. E.; Gomes, A.; Das, M.; Sur, P.; Mitra, S.; Vedasiromoni, J. R. Anti-inflammatory activity of tea (Camellia sinensis) root extract. *Life Sciences* (2004), 74(15), 1839-1849.

Chen, P.; Wang, H.; Du, Q.; Ito, Y. Purification of long-chain fatty acid ester of epigallocatechin-3-O-gallate by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* (2002), 982(1), 163-165.

Cheong, W. J.; Park, M. H.; Kang, G. W.; Ko, J. H.; Seo, Y. J. Determination of Catechin Compounds in Korean Green Tea Infusions under Various Extraction Conditions by High Performance Liquid Chromatography. *Bull. Kor. Chem. Soc.* (2005), 26(5), 747-754.

Chiu, F. L.; Lin, J. K. HPLC Analysis of Naturally Occurring Methylated Catechins, 3″- and 4″-Methyl-epigallocatechin Gallate, in Various Fresh Tea Leaves and Commercial Teas and Their Potent Inhibitory Effects on Inducible Nitric Oxide Synthase in Macrophages. *J. Agric. Food Chem.* (2005), 53, 7035-7042.

Choi, C.-H.; Kim, S.-H. Role of gallic acid in inflammatory allergic process. *Kor. J. Physiol. Pharmacol.* (2006), 10(2), 101-108.

Dalluge, J. J.; Nelson, B. C.; Thomas, J. B.; Sander, L. C. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* (1998), 793, 265-274.

Dat, N. T.; Cai, X. F.; Shen, S. Q.; Lee, I. S.; Kim, Y. H. New Inhibitor against Nuclear Factor of Activated T Cells Transcription from *Ribes fasciculatum* var. *chinense*. *Chem. Pharm. Bull.* (2005), 53(1) 114-117.

Davis, A. L.; Cai, Y.; Davies, A. P.; Lewis, J. R. ^{1}H and ^{13}C NMR assignments of some green tea polyphenols. *Magn. Reson. Chem.* (1996), 34(11), 887-890.

Del Soldato, P. Nitrooxy derivatives of antiinflammatory/analgesic compounds for the treatment of arthritis. *PCT Int. Appl.* (2003), 71 pp.

Dona, M.; Dell'Aica, I.; Calabrese, F.; Benelli, R.; Morini, M.; Albini, A.; Garbisa, S. Neutrophil Restraint by Green Tea: Inhibition of Inflammation, Associated Angiogenesis, and Pulmonary Fibrosis. *J. Immunol.* (2003), 170(8), 4335-4341.

Fernández, P. L.; Pablos, F.; Martín, M. J.; González, A. G. Study of Catechin and Xanthine Tea Profiles as Geographical Tracers. *J. Agric. Food Chem.* (2002), 50, 1833-1839.

Friedman, M.; Henika, P. R.; Levin, C. E.; Mandrell, R. E.; Kozukue, N. Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *J. Food Protection* (2006), 69(2), 354-361.

Gao, H.; Kuroyanagi, M.; Wu, L.; Kawahara, N.; Yasuno, T.; Nakamura, Y. Antitumor-promoting constituents from *Dioscorea bulbifera* L. in JB6 mouse epidermal cells. *Biol. Pharm. Bull.* (2002), 25(9), 1241-1243.

Geetha, T.; Garg, A.; Chopra, K.; Pal Kaur, I. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutat. Res.* (2004), 556(1-2), 65-74.

Guetsky, R.; Kobiler, I.; Wang, X.; Perlman, N.; Gollop, N.; Avila-Quezada, G.; Hadar, I.; Prusky, D. Metabolism of the flavonoid epicatechin by laccase of Colletotrichum gloeosporioides and its effect on pathogenicity on avocado fruits. *Phytopathology* (2005), 95(11), 1341-1348.

Hamilton-Miller, J. M.; Shah, S. Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J. Antimicrob. Chemother.* (2000), 46(5), 852-3.

Handa, O.; Naito, Y.; Takagi, T.; Ishikawa, T.; Ueda, M.; Matsumoto, N.; Kokura, S.; Ichikawa, H.; Yoshida, N.; Shimoi, K.; Yoshikawa, T. Inhibitory effects of catechins on neutrophil-dependent gastric inflammation. *Redox Rep.* (2002), 7(5), 324-328.

Hara, Y.; Matsuzaki, S.; Nakamura, K. Antitumor activity of tea catechins. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi* (1989), 42(1), 39-45.

Hasa, J; Hauer, J. ECG changes during treatment with anti-inflammatory corticosteroids. *Casopis lekar u c eskych* (1963), 102, 31-36.

Hase, T.; Murase, T.; Okuda, M.; Shibuya, J.; Nishizawa, Y.; Tokimitsu, I. Antiwrinkle agents containing gallic acid esters for cosmetics. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (1996), 6 pp.

Hayakawa, F.; Kimura, T.; Hoshino, N.; Ando, T. DNA cleavage activities of (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin, (+)-catechin, and (-)-epigallocatechin gallate with various kind of metal ions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (1999), 63(9), 1654-1656.

Hayes, C. J.; Whittaker, B. P.; Watson, S. A.; Grabowska, A. M. Synthesis and Preliminary Anticancer Activity Studies of C4 and C8-Modified Derivatives of Catechin Gallate (CG) and Epicatechin Gallate (ECG). *J. Org. Chem.* (2006), 71(26), 9701-9712.

Heo, H. J.; Lee, C. Y. Epicatechin and Catechin in Cocoa Inhibit Amyloid β Protein Induced Apoptosis. *J. Agr. Food Chem.* (2005), 53(5), 1445-1448.

Higdon, J. V.; Frei, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit. Rev. in Food Sci. Nutrit.* (2003), 43(1), 89-143.

Higuchi, T.; Higuchi, M.; Higuchi, N.; Koyama, H.; Shibata, H.; Higuchi, T. Antiviral/antiinflammatory agents containing phenol derivatives. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2006), 23 pp.

Ho, C.-T.; Ghai, G.; Sang, S.; Jhoo, J.-W.; Huang, M.-T.; Rosen, R. T.; Dushenkov, S. Preparation of benzotropolone derivatives as antioxidants and anti-inflammatory agents. U.S. Pat. Appl. Publ. (2005), 16 pp.

Huang, M.-T.; Ho, C.-T. Inflammatory process and molecular targets for anti-inflammatory phenolic nutraceuticals. Abstracts of Papers, 226th ACS National Meeting, New York, NY, United States, September 7-11, 2003 (2003), AGFD-034.

Ihantola-Vormisto, A.; Summanen, J.; Kankaanranta, H.; Vuorela, H.; Asmawi, Z. M.; Moilanen, E. Anti-inflammatory activity of extracts from leaves of *Phyllanthus emblica*. *Planta*

Med. (1997), 63(6), 518-524.

Isemura, M.; Hayakawa, S. Regulation of mRNA expression of apoptosis-related molecules by tea components. *Eiyo: Hyoka to Chiryo* (2003), 20(2), 159-163.

Jeon, S.-Y.; Bae, K.H.; Seong, Y.-H.; Song, K.-S. Green tea catechins as a BACE1 (beta-secretase) inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2003), 13(22), 3905-3908.

Jin, W. Y.; Min, B. S.; Youn, U. J.; Hung, T. M.; Song, K. S.; Seong, Y. H.; Bae, K. H. Chemical Constituents from the Leaf and Twig of *Acer okamotoanum* Nakai and their Cytotoxicity. *Kor. J. Med. Crop Sci.* (2006), 14(2), 77-81.

Kapoor, M.; Howard, R.; Hall, I.; Appleton, I. Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. *Amer. J. Pathol.* (2004), 165(1), 299-307.

Kawai, K.; Tsuno, N. H.; Kitayama, J.; Okaji, Y.; Yazawa, K.; Asakage, M.; Hori, N.; Watanabe, T.; Takahashi, K.; Nagawa, H. Epigallocatechin gallate attenuates adhesion and migration of CD8+ T cells by binding to CD11b. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2004), 113(6), 1211-1217.

Kawai, K.; Tsuno, N. H.; Kitayama, J.; Okaji, Y.; Yazawa, K.; Asakage, M.; Sasaki, S.; Watanabe, T.; Takahashi, K.; Nagawa, H. Epigallocatechin gallate induces apoptosis of monocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2005), 115(1), 186-191.

Kennedy, D. O.; Kojima, A.; Moffatt, J.; Yamagiwa, H.; Yano, Y.; Hasuma, T.; Otani, S.; Matsui-Yuasa, I. Cellular thiol status-dependent inhibition of tumor cell growth via modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by (-)-epigallocatechin. *Cancer Lett.* (Shannon, Ireland) (2002), 179(1), 25-32.

Kim, H. K.; Namgoong, S. Y.; Kim, H. P. Antiinflammatory activity of flavonoids: Mouse ear edema inhibition. *Arch. Pharm. Res.* (1993), 16(1), 18-24.

Kim, M.-J.; Ryu, G. R.; Kang, J.-H.; Sim, S. S.; Min, D. S.; Rhie, D.-J.; Yoon, S. H.; Hahn,

S. J.; Jeong, I.-K.; Hong, K.-J.; Kim, M.-S.; Jo, Y.-H. Inhibitory effects of epicatechin on interleukin-1β-induced inducible nitric oxide synthase expression in RINm5F cells and rat pancreatic islets by down-regulation of NF-k B activation. *Biochem. Pharmacol.* (2004), 68(9), 1775-1785.

Kim, S.-H.; Jun, C.-D.; Suk, K.; Choi, B.-J.; Lim, H.; Park, S.; Lee, S. H.; Shin, H.-Y.; Kim, D.-K.; Shin, T.-Y. Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. *Toxicol. Sci.* (2006), 91(1), 123-131.

Ko, C. H.; Li, K.; Ng, P. C.; Fung, K. P.; Li, C. L.; Wong, R. P.-O.; Chui, K. M.; Gu, G. J.-S.; Yung, E.; Wang, C.-C.; Fok, T. F. Pro-oxidative effects of tea and polyphenols, epigallocatechin-3-gallate and epigallocatechin, on G6PD-deficient erythrocytes in vitro. International *J. Mol. Med.* (2006), 18(5), 987-994.

Kobayashi, K.; Goriki, H.; Nimura, Y. Preparation of protoporphyrin IX ester with epigallocatechin as inflammation inhibitor. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2006), 14 p.

Kroes, B. H.; Van den Berg, A. J. J.; Quarles van Ufford, H. C.; Van Dijk, H.; Labadie, R. P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med.* (1992), 58(6), 499-504.

Kuroda, Y. Bio-antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells. *Mut. Res.* (1996), 361(2,3), 179-186.

Lee, K. W.; Kundu, J. K.; Kim, S. O.; Chun, K.-S.; Lee, H. J.; Surh, Y.-J. Cocoa polyphenols inhibit phorbol ester-induced superoxide anion formation in cultured HL-60 cells and expression of cyclooxygenase-2 and activation of NF-κ B and MAPKs in mouse skin in vivo. *J. Nutr.* (2006), 136(5), 1150-1155.

Liang, H.; Liang, Y.; Dong, J.; Lu, J.; Xu, H.; Wang, H. Decaffeination of fresh green tea leaf (*Camellia sinensis*) by hot water treatment. *Food Chem.* (2006), Volume Date 2007, 101(4), 1451-1456.

Lim, Y. C.; Lee, S.-H.; Song, M. H.; Yamaguchi, K.; Yoon, J.-H.; Choi, E. C.; Baek, S. J. Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1

suppression in head and neck squamous carcinoma cells. *Eur. J. Cancer* (2006), 42(18), 3260-3266.

Lin, Y.-L.; Lin, J.-K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-k B. *Mol. Pharmacol.* (1997), 52(3), 465-472.

Liu, G.; Wang, Q.; Yang, H.; Liao, Z. Pharmacological study of gallic acid from *Ampelopsis brevipedunculata*. *Nanjing Yaoxueyuan Xuebao* (1983), 2, 43-47.

Mackenzie, G. G.; Carrasquedo, F.; Delfino, J. M.; Keen, C. L.; Fraga, C. G.; Oteiza, P. I. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-k B activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J.* (2004), 18(1), 167-169, 10.1096/0fj.03-0402fje.

Matteucci, E.; Rizvi, S. I.; Giampietro, O. Erythrocyte sodium/hydrogen exchange inhibition by (-)-epicatechin. *Cell Biol. Int.* (2001), 25(8), 771-776.

Mendoza-Wilson, A. M.; Glossman-Mitnik, D. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. *Theochem.* (2006), 761(1-3), 97-106.

Mizushina, Y.; Saito, A.; Tanaka, A.; Nakajima, N.; Kuriyama, I.; Takemura, M.; Takeuchi, T.; Sugawara, F.; Yoshida, H. Structural analysis of catechin derivatives as mammalian DNA polymerase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005), 333(1), 101-109.

Murase, T.; Hase, T.; Tokimitsu, I.; Shibuya, Jusuke; N. Y. Antiinflammatory agents containing gallic acid esters. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (1996), 6 pp.

Netsch, M. I.; Gutmann, H.; Aydogan, C.; Drewe, J. Green tea extract induces interleukin-8 (IL-8) mRNA and protein expression but specifically inhibits IL-8 secretion in caco-2 cells. *Planta Med.* (2006), 72(8), 697-702.

Netsch, M. I.; Gutmann, H.; Aydogan, C.; Drewe, J. Green tea extract induces interleukin-8 (IL-8) mRNA and protein expression but specifically inhibits IL-8 secretion in Caco-2 cells.

Planta Med. (2006), 72(8), 697-702.

Nissim, H. A.; Krupka, M. E.; Zuckerbraun, H. L.; Babich, H. Differential in vitro cytotoxicity of (-)-Epicatechin Gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. Abstracts of Papers, 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, March 13-17, (2005), CHED-792.

Noe, V.; Penuelas, S.; Lamuela-Raventos, R. M.; Permanyer, J.; Ciudad, C. J.; Izquierdo-Pulido, M. Epicatechin and a cocoa polyphenolic extract modulate gene expression in human Caco-2 cells. *J. Nutr.* (2004), 134(10), 2509-2516.

Owen, R. W.; Haubner, R.; Hull, W. E.; Erben, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H.; Haber, B. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem. Toxicol.* (2003), 41(12), 1727-1738.

Park, J.-W.; Choi, Y. J.; Suh, S.-I.; Kwon, T. K. Involvement of ERK and Protein Tyrosine Phosphatase Signaling Pathways in EGCG-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Raw 264.7 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001), 286(4), 721-725.

Pelillo, M.; Bonoli, M.; Biguzzi, B.; Bendini, A.; Toschi, T. G.; Lercker, G. An investigation in the use of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the quantification of tea catechins. *Food Chem.* (2004), 87, 465-470.

Pettinari, A.; Amici, M.; Cuccioloni, Ma.; Angeletti, M.; Fioretti, E.; Eleuteri, A. M. Effect of Polyphenolic Compounds on the Proteolytic Activities of Constitutive and Immuno-Proteasomes. *Antioxidants & Redox Signaling* (2006), 8(1 & 2), 121-129.

Piskula, M. K.; Da Silva, E. L.; Terao, J. Antioxidative activity of (-)-epicatechin in rat plasma: intragastric administration and its metabolites. *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals* (2000), 202-213.

Porath, D.; Riegger, C.; Drewe, J.; Schwager, J. Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2005), 315(3), 1172-1180.

Potta, S. P.; Doss, M. X.; Hescheler, J.; Sachinidis, A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): A structural target for the development of potential therapeutic drugs against anti-proliferative diseases. *Drug Design Rev.--Online* (2005), 2(1), 85-91.

Quine, S. D.; Raghu, P. S. Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacol. Rep.* (2005), 57(5), 610-615.

Rizvi, S. I.; Zaid, M. A. Insulin-like effect of (-)epicatechin on erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity in type 2 diabetes mellitus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (2001), 28(9), 776-778.

Sakanaka, S. A Novel Convenient Process To Obtain a Raw Decaffeinated Tea Polyphenol Fraction Using a Lignocellulose Column. *J. Agric. Food Chem.* (2003), 51(10), 3140-3143.

Sanae, F.; Miyaichi, Y.; Hayashi, H. Potentiation of vasoconstrictor response and inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by gallic acid in rat aorta. *Planta Med.* (2002), 68(8), 690-693.

Santos, A. R. S.; De Campos, R. O. P.; Miguel, O. G.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B. The involvement of K+ channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. *Eur. J. Pharmacol.* (1999), 379(1), 7-17.

Sato, Y.; Hara, Y. Efficacy enhancing agent for anticancer drug. PCT Int. Appl. (2006), 22 pp.

Savi, L. A.; Barardi, C. R. M.; Simoes, C. M. O. Evaluation of Antiherpetic Activity and Genotoxic Effects of Tea Catechin Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* (2006), 54(7), 2552-2557.

Schroeder, P.; Klotz, L.-O.; Buchczyk, D. P.; Sadik, C. D.; Schewe, T.; Sies, H. Epicatechin Selectively Prevents Nitration but Not Oxidation Reactions of Peroxynitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001), 285(3), 782-787.

Schroeder, P.; Zhang, H.; Klotz, L.-O.; Kalyanaraman, B.; Sies, H. (-)-Epicatechin Inhibits

Nitration and Dimerization of Tyrosine in Hydrophilic as Well as Hydrophobic Environments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001), 289(5), 1334-1338.

Sehm, J.; Polster, J.; Pfaffl, M. W. Effects of Varied EGCG and (+)-Catechin Concentrations on Proinflammatory Cytokines mRNA Expression in ConA-Stimulated Primary White Blood Cell Cultures. *J. Agric. Food Chem.* (2005), 53(17), 6907-6911.

Shahrzad, S.; Aoyagi, K.; Winter, A.; Koyama, A.; Bitsch, I. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J. Nutr.* (2001), 131(4), 1207-1210.

Shoji, T.; Mutsuga, M.; Nakamura, T.; Kanda, T.; Akiyama, H.; Goda, Y. Isolation and Structural Elucidation of Some Procyanidins from Apple by Low-Temperature Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.* (2003), 51(13), 3806-3813.

Si, W.; Gong, J.; Tsao, R.; Kalab, M.; Yang,, R.; Yin, Y. Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *J. Chromatogr. A* (2006), 1125(2), 204-210.

Song, J.-M.; Lee, K.-H.; Seong, B.-L. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res.* (2005), 68(2), 66-74.

Swarnalakshmi, T.; Gomathi, K.; Sulochana, N.; Baskar, E. Amala; Parmar, N. S. Antiinflammatory activity of (-)-epicatechin, a bioflavonoid isolated from *Anacardium occidentale* Linn. *Indian J. Pharm. Sci.* (1981), 43(6), 205-8.

Takano, K. Rebuttal on Inhibitory Effect of (-)-Epigallocatechin 3-Gallate, a Polyphenol of Green Tea, on Neutrophil Chemotaxis in Vitro and in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* (2005), 53(4), 1307-1308.

Takano, K.; Nakaima, K.; Nitta, M.; Shibata, F.; Nakagawa, H. Inhibitory Effect of (-)-Epigallocatechin 3-Gallate, a Polyphenol of Green Tea, on Neutrophil Chemotaxis in Vitro and in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* (2004), 52(14), 4571-4576.

Tan, X.; Zhang, Y.; Jiang, B.; Zhou, D. Influence of (-)-epigallocatechin on the cell cycle and

induction of apoptosis in LoVo colon carcinoma cells. *Zhongguo Yaolixue Tongbao* (1999), 15(1), 56-59.

Tedeschi, E.; Suzuki, H.; Menegazzi, M. Antiinflammatory action of EGCG, the main component of green tea, through STAT-1 inhibition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2002), 973 (Cell Signaling, Transcription, and Translation as Therapeutic Targets), 435-437.

Trompezinski, S.; Denis, A.; Schmitt, D.; Viac, J. Comparative effects of polyphenols from green tea (EGCG) and soybean (genistein) on VEGF and IL-8 release from normal human keratinocytes stimulated with the proinflammatory cytokine TNFa. *Arch. Dermatol. Res.* (2003), 295(3), 112-116.

Tsuji, A.; Yamamoto, M.; Kawahara, K.; Sano, M.; Miyase, T. Anti-allergy and anti-inflammatory catechins from tea extracts. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2000), 8 pp.

Ugartondo, V.; Mitjans, M.; Lozano, C.; Torres, J. L.; Vinardell, M. P. Comparative Study of the Cytotoxicity Induced by Antioxidant Epicatechin Conjugates Obtained from Grape. *J. Agric. Food Chem.* (2006), 54(18), 6945-6950.

Unno, T.; Tamemoto, K.; Yayabe, F.; Kakuda, T. Urinary Excretion of 5-(3′,4′-Dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone, a Ring-Fission Metabolite of (-)-Epicatechin, in Rats and Its in Vitro Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* (2003), 51(23), 6893-6898.

van der Merwe, J. D.; Joubert, E.; Richards, E. S.; Manley, M.; Snijman, P. W.; Marnewick, J. L.; Gelderblom, W. C. A. A comparative study on the antimutagenic properties of aqueous extracts of *Aspalathus linearis* (rooibos), different *Cyclopia* spp. (honeybush) and *Camellia sinensis* teas. *Mut. Res.* (2006), 611(1-2), 42-53.

Vuotto, M. L.; Miranda, R.; Ritieni, A.; Basile, A.; Ricciardi, L.; Di Prisco, R.; Nicolosi, G.; Mascolo, N. Improvement of (+)-catechin inhibitory activity on human PMN respiratory burst by (+)-3-O-propionyl and (-)-3-O-valeryl substitution. *J. Pharm. Pharmacol.* (2003), 55(3), 399-405.

Wagner, H.; Dorsch, W. Pharmaceuticals containing a gallic aid derivative and/or quercetin

and method for isolating them. *Ger. Offen.* (1992), 8 pp.

Wang, Y.; Mei, Y.; Feng, D.; Xu, L. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects mice from concanavalin A-induced hepatitis through suppressing immune-mediated liver injury. *Clin. Exp. Immunol.* (2006), 145(3), 485-92.

Wang, H.; Helliwell, K.; You, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chem.* (2000), 68, 115-121.

Wang, J.; Mazza, G. Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN-γ-Activated RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem.* (2002), 50(15), 4183-4189.

Wang, Y.; Mei, Y.; Feng, D.; Xu, L. (-)-epigallocatechin-3-gallate protects mice from concanavalin a-induced hepatitis through suppressing immune-mediated liver injury. *Clin. Exp. Immunol.* (2006), 145(3), 485-492.

Watson, J. L.; Vicario, M.; Wang, A.; Moreto, M.; McKay, D. M. Immune cell activation and subsequent epithelial dysfunction by *Staphylococcus enterotoxin* B is attenuated by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate. *Cell. Immunol.* (2005), 237(1), 7-16.

Watson, J. L.; Ansari, S.; Cameron, H.; Wang, A.; Akhtar, M.; McKay, D. M. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate blocks epithelial barrier dysfunction provoked by IFN-γ but not by IL-4. *Amer. J. Physiol.* (2004), 287(5, Pt. 1), G954-G961.

Watson, J. L.; Vicario, M.; Wang, A.; Moreto, M.; McKay, D. M. Immune cell activation and subsequent epithelial dysfunction by Staphylococcus enterotoxin B is attenuated by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate. *Cell. Immunol.* (2005), 237(1), 7-16.

Wheeler, D. S.; Catravas, J. D.; Odoms, K.; Denenberg, A.; Malhotra, V.; Wong, H. R. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1b-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *J. Nutrit.* (2004), 134(5), 1039-1044.

Xu, D.; Mei, X.; Xu, S. Solid dispersion of (-)-epigallocatechin-3-gallate-zinc complex compound, its preparation and application. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* (2006), 26 pp.

Yamada, M.; Murohisa, B.; Oguni, I.; Harada, N.; Hara, Y. Effects of tea polyphenols against *Helicobacter pylori*. Book of Abstracts, 213th ACS National Meeting, San Francisco, April 13-17 (1997), AGFD-069.

Yang, L.-L.; Chen, L. G.; Chen, Y.-L. Antiinflammatory principle constituents from leaves of Toona sinensis. Abstracts of Papers, 228th ACS National Meeting, Philadelphia, PA, United States, August 22-26 2004, AGFD-108.

Youn, Y.-C. The effects of (-)-epigallocatechin gallate on rat hippocampal organotypic slice cultures treated with 1-42β-amyloid protein. *Taehan Sin'gyong Kwahak Hoechi* (2005), 23(6), 806-813.

Yue, P.; Wu, S. Experiment on decaffeination from green tea using supercritical CO_2. *Chaye Kexue* (2002), 22(2), 131-134.

Zhou, Y.-D.; Kim, Y.-P.; Li, X.-C.; Baerson, S. R.; Agarwal, A. K.; Hodges, T. W.; Ferreira, D.; Nagle, D. G. Hypoxia-Inducible Factor-1 Activation by (-)-Epicatechin Gallate: Potential Adverse Effects of Cancer Chemoprevention with High-Dose Green Tea Extracts. *J. Nat. Prod.* (2004), 67(12), 2063-2069.

강삼식, 김영식, 배기환, 서은경, 손건호, 신국현, 최재수, 천연물성분 분광분석 자료집, 한림원 (2004), 936, 939.

강삼식, 손건호, 천연물성분 구조결정법, 서울대학교출판부 (2000), 710, 711.

우원식, 천연물화학 연구법, 서울대학교 출판부 (1996), 71-77.

천연물화학교재출판위원회, 천연물화학, 영림사 (2003), 63-147.

편집순서 8

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.