

(뒷면)

(앞면)

백운풀로부터 AMPK 활성화물질을 이용한 체중조절용 기능성 소재 개발
농림축산식품부

발간등록번호

11-1543000-000197-01

백운풀로부터 AMPK 활성화물질을
이용한 체중조절용 기능성 소재 개발

Development of anti-obesity material
having AMPK activating effect from
Hedyotis diffusa

경북대학교

농림축산식품부

주 의
(편집순서 8)

↑
6cm
↓

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “백운풀로부터 AMPK 활성화물질을 이용한 체중조절용 기능성 소재 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 07월 26일

주관연구기관명 : 경북대학교

주관연구책임자 : 송 경 식

제1세부연구책임자 : 송 경 식

연 구 원 : 이 준 엽

연 구 원 : 천 소 현

연 구 원 : 김 세 용

제2세부연구책임자 : 허 태 린

연 구 원 : 권 순 일

연 구 원 : 류 자 희

연 구 원 : 오 명 숙

요 약 문

I. 제 목: 백운풀로부터 AMPK 활성화 물질을 이용한 체중조절용 기능성 소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

농림기술센터와 농민에 의해 발굴, 재배된 우리나라 고유의 유전자원인 백운풀의 이용성 증대를 위해,

1. 체중 조절과 관련된 *in vitro* 및 *in vivo* 효능을 평가하고,
2. 체중 조절 활성을 갖는 화합물의 본체를 확인하며,
3. 산업화를 위한 분석 방법 및 validation을 수행함으로써 농가에 새로운 경제작물을 보급하는 것을 최종적인 연구목표로 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 백운풀의 *in vitro* 체중조절작용 (AMPK 활성화능) 평가
 - 다양한 유기용매 추출물들에 대한 AMPK 및 ACC 인산화 능력 측정
 - AMPK 활성화에 따른 포도당 흡수촉진 효능/Glucose transporter의 세포막 이동증가 효능 분석
 - 지방산 베타산화 능력 증가 효능 분석
2. 백운풀의 *in vivo* 체중조절작용 (AMPK 활성화능) 평가
 - 식이유도 비만생쥐(DIO) 모델에서 백운풀 추출물의 효능 분석
 - 유전적 비만 생쥐(Ob/Ob) 생쥐에서 백운풀 추출물의 효능 분석
3. 지표성분의 설정 및 분석법 개발/validation
 - 각종 크로마토그래피를 이용한 지표 및 유효성분의 분리/각종 기기분석을 이용한 구조동정
 - HPLC-ELSD/DAD 등을 이용한 분석법 확립/LOD, LOQ, accuracy 등의 validation 수행
4. 활성분획 제조법 및 QC법 확립
 - 유효성분 rich fraction 제조법 확립/산업화를 위한 QC법 제시
5. 지적재산권 취득 및 기업기술이전/산방화이초와의 차별성 검토/농가보급방안 모색

IV. 연구개발결과

1. 백운풀 에탄올 추출물로부터 총 8종의 화합물이 분리 및 구조동정 되었음 (digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, ursolic acid, (*E*)/(*Z*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, asperuloside, geniposide, daphylloside, (*E*)/(*Z*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester).
2. 백운풀의 품질표준화를 위한 지표성분으로 digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester를 선정하였으며, 이들에 대한 HPLC 최적분석조건을 확립하였음.
3. 4종의 지표성분에 대한 validation을 실시하였음 (검출한계, 검량한계, 재현성, 일내 및 일간 정밀성·정확성 등).
4. 분리된 8종의 화합물 중 ursolic acid, digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone이 AMPK 인산화에 효과가 있는 것으로 조사되었음. 이들을 대상으로 AMPK의 상·하위 메커니즘에 대한 작용기작을 조사하였음.
5. 화합물의 구조와 AMPK 활성 간의 상관관계 탐색을 위해 구입 및 유기합성을 통한 15종의 anthraquinone 계통 화합물을 수집하였으며, AMPK 활성을 비교하여 구조-활성 상관관계를 예측하였음.
6. 비만 생쥐모델 (ob/ob mouse)에 백운풀 추출물을 경구투여한 결과, 대조군에 비해 체중, 간중량/체중 비, 먹이 섭취량 및 복부 체지방이 유의적으로 감소하였음. 백운풀 추출물 투여군에서 혈당량 감소효과가 관찰되었으며, 혈액 내 총 콜레스테롤 및 중성지방 수치가 효과적으로 감소하였음. 또한 간조직 내 지방량이 감소되었으며, 췌장 내 islet이 정상적인 형태로 변화되는 것이 관찰되었음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 새로운 농가 소득작물 개발에 의한 농가 소득증대에 기여 (시가 건조 중량 kg당 5만원)
2. FTA를 대비한 국내 농업의 고도화에 기여
3. 백운풀 추출물의 건강기능 식품화에 따른 국내 식품산업 활성화에 기여
4. 3년의 기본 연구 종료 후, 후속 연구를 통해 독성검사 및 임상시험을 거쳐 개별인정형 건강기능식품으로 상품화

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

: Development of anti-obesity material having AMPK activating effect from *Hedyotis diffusa*

II. Purpose

1. Elucidation the effects of *Hedyotis diffusa* on obesity,
2. Isolation and determination of active compounds,
3. Establishing marker compounds of *H. diffusa* and development HPLC quantification analysis for quality control.

III. Contents

1. Evaluation of the effects of *Hedyotis diffusa* on obesity by AMPK activation *in vitro*.
 - The effects of several fractions from *H. diffusa* on the phosphorylation of AMPK and ACC.
 - Enhancement of glucose uptake, increase in translocation of glucose transporter into cell membrane by AMPK activation.
 - Increase in β -oxidation of fatty acid.
2. Evaluation of the effects of *H. diffusa* on obesity by AMPK activation *in vivo*.
 - Effects of the ethanolic extract of *H. diffusa* on diet-induced obesity mouse model (DIO).
 - Effects of the ethanolic extract of *H. diffusa* on genetic obesity mouse model (Ob/Ob).
3. Establishing marker compounds, development HPLC analysis method, and validation.
 - Isolation and structure determination of marker and active components.
 - Development of the analysis method using by HPLC-ELSD/DAD, and validation.
4. Preparation of active fraction and establishing QC method.
 - Preparation of active component rich fraction and establishment of QC method for industrialization.
5. Acquisition of intellectual property and trial for industrialization / investigation of differences between *H. diffusa* and *H. corymbosa* / trial to propagation of *H. diffusa* to the farmhouse.

IV. Results

1. Eight compounds were isolated from the ethanolic extract of *H. diffusa* and the structures were determined by NMR analysis (digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, ursolic acid, (*E*)/(*Z*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, asperuloside, geniposide, daphylloside, (*E*)/(*Z*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester).
2. The marker compounds were selected [digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, and (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester] for quality standardization, and the optimum HPLC analysis conditions were developed.
3. The validation of 4 index components was performed (LOD, LOQ, RSD, precision and CV of intra-day and inter-day).
4. It was investigated that ursolic acid, digitolutein, and 2-hydroxy-3-methylanthraquinone isolated from *H. diffusa* effectively enhanced the phosphorylation of AMPK. Therefore, the effects of three compounds on up- and down-streams of AMPK were evaluated.
5. For the study of structure-activity relationship (SAR), 15 anthraquinones were collected by purchase and synthesis. SAR was estimated by observation the level of phosphorylated AMPK.
6. By oral administration of *H. diffusa* extract into ob/ob mouse models, the body weight, the ratio of liver weight to body weight, feed intake, and the body fat of abdomen were significantly decreased compared with the control group. In addition, it was observed that the levels of blood sugar, total cholesterol, and triglyceride were reduced. The liver fat was also decreased and the islet in pancreas was normalized by the extract of *H. diffusa*.

V. Outcomes and application plans

1. Contribution to increase in income of farmhouse by development of new crops (50,000 won/kg of dry weight).
2. Preparation for FTA.
3. Activation of food industry by development of *H. diffusa* as a health functional food.
4. Commercialization as a health functional food after follow-up studies such as toxic inspection and clinical test.

CONTENTS

(영 문 목 차)

- Chapter 1. The outline of the study
- Chapter 2. The present status of the technique development in the country and overseas
- Chapter 3. Contents and results
- Chapter 4. Achievement and contribution
- Chapter 5. Outcomes and application plans
- Chapter 6. The informations of science technology in overseas
- Chapter 7. The status of study facilities and equipments
- Chapter 8. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 참고문헌

[별첨 1] 연구개발보고서 초록

[별첨 2] 자체평가 의견서

[별첨 3] 연구결과 활용계획서

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 최종 목표

- 농림기술센터와 농민에 의해 발굴, 재배된 우리나라 고유의 유전자원인 백운풀의 이용성 증대를 위해,
 - 가. 체중 조절과 관련된 *in vitro* 및 *in vivo* 효능을 평가하고,
 - 나. 체중 조절 활성을 갖는 화합물의 본체를 확인하며,
 - 다. 산업화를 위한 분석 방법 및 validation을 수행함으로써 농가에 새로운 경제작물을 보급하는 토대를 마련하는 것을 최종적인 연구목표로 함.

2. 연구개발의 주요 내용

- 가. 백운풀의 *in vitro* 체중조절작용 (AMPK 활성화능) 평가.
 - (1) 다양한 유기용매 추출물들에 대한 AMPK 및 ACC 인산화 능력 측정.
 - (2) AMPK 활성화에 따른 포도당 흡수촉진 효능/Glucose transporter의 세포막 이동증가 효능 분석.
 - (3) 지방산 베타산화 능력 증가 효능 분석.
- 나. 백운풀의 *in vivo* 체중조절작용 (AMPK 활성화능) 평가.
 - (1) 식이유도 비만생쥐(DIO) 모델에서 백운풀 추출물의 효능 분석.
 - (2) 유전적 비만 생쥐(Ob/Ob) 생쥐에서 백운풀 추출물의 효능 분석.
- 다. 지표성분의 설정 및 분석법 개발/validation.
 - (1) 각종 크로마토그래피를 이용한 지표 및 유효성분의 분리/각종 기기분석을 이용한 구조동정.
 - (2) HPLC-ELSD/DAD 등을 이용한 분석법 확립.
 - (3) LOD, LOQ, accuracy 등의 validation 수행.
- 라. 활성분획 제조법 및 QC법 확립.
 - (1) 유효성분 rich fraction 제조법 확립/산업화를 위한 QC법 제시.
- 마. 지적재산권 취득 및 기업기술이전/산방화이초와의 차별성 검토/농가보급방안 모색.

3. 과제별 연구개발의 목표 및 내용

가. 제1세부과제

: 백운풀로부터 체중조절용 기능성 소재 개발을 위한 지표성분 설정 및 분석방법의 개발.

- (1) 분배계수 차에 의한 분획조제.
- (2) 각종 크로마토그래피를 이용한 활성 분획의 획득.
- (3) MPLC, HPLC 등을 이용한 지표성분의 단리.
- (4) NMR 등 각종 기기분석을 이용한 활성성분의 동정.
- (5) HPLC/LC-MS 등을 이용한 지표성분의 분석법 개발.
- (6) 분석방법의 validation (정확성, 정밀성, LOD, LOQ 등).
- (7) 품질 관리를 위한 QC법 확립.
- (8) 실험실 규모의 활성분획 조제법 확립.
- (9) 중국산 산방화이초와의 차별성 검토.

나. 제2세부과제

: 백운풀의 체중조절 효능 평가 및 작용 기작 규명.

- (1) AMPK 활성화 능력이 우수한 백운풀 추출물의 최적 제조방법 개발.
- (2) 백운풀 추출물에 함유된 AMPK 활성화 지표물질 분리과정 중 AMPK 활성화도 분석 (제1세부과제와 연계).
- (3) 백운풀 추출물의 체지방 증가 억제에 대한 동물실험.
- (4) 백운풀 추출물의 투여 효과에 따른 혈중 지질 저하효과 검증.
- (5) 백운풀 추출물의 투여에 따른 동물 각종 지방조직 변화조사.
- (6) 백운풀 추출물의 인체에 대한 최적 투여 용량설정을 위한 반복 동물실험.

다. 참여 기업 (농민).

: 백운풀의 재배 및 안정적 공급.

4. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2010	○ 지표성분의 분리	1. 분배계수 차에 의한 분획조제 2. 각종 크로마토그래피를 이용한 활성 분획의 획득 3. 단리를 위한 분리 조건 검토
		○ 최적화된 추출물제조방법의 확인 및 AMPK 활성화에 대한 생화학적 기작 규명	1. 추출물 추출 용매에 따른 활성 비교 2. 추출물 물리적 변화에 따른 활성 분석 3. 유효성분의 AMPK 활성화에 대한 생화학적 기작 규명
2차년도	2011	○ 지표성분의 동정 및 분석법개발	1. MPLC, HPLC 등을 이용한 지표성분의 단리 2. NMR 등 각종 기기분석을 이용한 활성성분의 동정 3. HPLC/LC-MS 등을 이용한 지표성분의 분석법 개발
		○ 식이 유도 비만생쥐에서 체지방감소 및 혈중지질 감소 효과 분석	1. 비만생쥐(Diet-induced obesity) 모델에서 최적 추출물을 이용한 체지방 감소 효과 조사 2. 비만생쥐(Diet-induced obesity) 모델에서 각종 혈액 생화학적 검사 및 조직 검사
3차년도	2012	○ 분석법 validation 및 QC법 확립	1. 개발된 분석법의 validation (정확, 정밀, 완전성 등) 2. 품질 관리를 위한 정량법 확립 3. 실험실 수준의 활성분획 조제법 확립 4. 산방화이초와의 화학적 차별성 등 검토
		○ 유전적 비만생쥐에서 체지방감소 및 혈중지질 감소 효과 분석	1. 유전적 비만생쥐 (Ob/Ob)에서 체지방 증가억제에 대한 추출물 효과 조사 2. 유전적 비만생쥐 (Ob/Ob)에서 각종 혈액 생화학적 검사 및 조직 검사 3. 독성시험

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
활성물질의 분리동정 기술	독일/미국	95%	95%	100%	
지표성분 분석법	독일/미국	95%	95%	100%	
추출물을 이용한 항비만 건강식품 개발	선진7개국	80%	85%	90%	
동물효능검증기술	선진7개국	80%	85%	90%	

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미.
 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시.
 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시.
 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성.

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽, 중국)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), STN DB
검색기간	최근 5년간 (2004-2008)
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 연관성

개발기술명		백운풀 관련	항비만 중 AMPK 관련
Keyword		<i>Hedyotis diffusa</i>	AMPK/obesity
검색건수		237	44
유효특허건수		3건 이상	3건 이상
핵심특허 및 관련성	특허명	First-aid solution comprising chinese medicinal preparations for promoting blood production, and its preparation method.	New preventives or remedies containing leptin and AMPK and PPARα activators for obesity, diabetes and lipid metabolic disorders.
	보유국	중국	일본
	등록년도	2008	2005
	관련성(%)	5% 이하	20%
	유사점	백운풀 사용	AMPK 활성화에 의한 비만조절
	차이점	비만과 무관	식물추출물이 아닌 chemical
핵심특허 및 관련성	특허명	Herbal compositions comprising extracts of <i>Hedyotis diffusa</i> , <i>Prunella vulgaris</i> , and <i>Viola alisoviana</i> , for the inhibition of human immunodeficiency virus.	Naphthoquinone-based pharmaceutical composition for treatment or prevention of diseases involving obesity, diabetes, metabolic syndrome, neuro-degenerative diseases and mitochondria dysfunction diseases.
	보유국	미국	한국 (PCT)
	등록년도	2008	2008
	관련성(%)	5% 이하	20%
	유사점	백운풀 사용	AMPK 활성화에 의한 비만조절
	차이점	비만과 무관	식물추출물이 아닌 chemical
핵심특허 및 관련성	특허명	Method for extracting iridoid compound e-6-o-p-coumaroyl scandoside methyl ester from <i>Hedyotis</i> .	Rosemary/ <i>Rosmarinus officinalis</i> and/or <i>Salvia officinalis</i> as AMPK activators.
	보유국	중국	일본
	등록년도	2007	2008
	관련성(%)	5% 이하	30%
	유사점	백운풀 사용	AMPK 활성화에 의한 비만조절
	차이점	비만과 무관	식물추출물이나 백운풀과 무관

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미.
 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미.
 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석.

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽, 중국)
논문 DB	STN DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간 (2004-2008)
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	백운풀 관련	항비만 중 AMPK 관련	
Keyword	<i>Hedyotis diffusa</i>	AMPK/obesity	
검색건수	103	530	
유효논문건수	3건 이상	3건 이상	
핵심논문 및 관련성	논문명	Correlation of Ca ²⁺ current features of nasopharyngeal carcinoma cells with different metastatic potentiality of their moving abilities.	Metabolic effects of resveratrol in mammals - a link between improved insulin action and aging.
	학술지명	<i>Aizheng</i>	<i>Current Aging Science</i>
	저자	Liu, Shujing; Tian, Daofa; He, Yingchun; Zeng, Liang; Huang, Chen; Liu, Yuqin	Frojdo, Sara; Durand, Christine; Pirola, Luciano
	게재년도	2007	2008
	관련성(%)	10%	5%
	유사점	백운풀을 대상으로한 연구	AMPK관련 연구
	차이점	항비만관련성 없음	소재탐색이 아닌 메커니즘연구
핵심논문 및 관련성	논문명	Fingerprint of <i>Hedyotis diffusa</i> Willd. by HPLC-MS.	Chronic activation of AMP-activated protein kinase- α 1 in liver leads to decreased adiposity in mice.
	학술지명	<i>Phytochemical Analysis</i>	<i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>
	저자	Yang, Ting; Yang, Yi-Hua; Yang, Ju-Yun; Chen, Ben-Mei; Duan, Ju-Ping; Yu, Shu-Yi; Ouyang, Hong-Tao; Cheng, Jun-Ping; Chen, Yu-Xiang	Yang, Jian; Maika, Shanna; Craddock, Lauren; King, Judy A.; Liu, Zhi-Mei
	게재년도	2008	2008
	관련성(%)	30%	5%
	유사점	백운풀을 대상으로한 연구/성분분석	AMPK관련 연구
	차이점	항비만관련성 없음/약효성분아님	소재탐색이 아닌 메커니즘연구
핵심논문 및 관련성	논문명	A comparable, chemical and pharmacological analysis of the traditional Chinese medicinal herbs <i>Oldenlandia diffusa</i> and <i>O. corymbosa</i> and a new valuation of their biological potential.	Anti-obesity effects of <i>Juniperus chinensis</i> extract are associated with increased AMP-activated protein kinase expression and phosphorylation in the visceral adipose tissue of rats.
	학술지명	<i>Phytomedicine</i>	<i>Biological & Pharmaceutical Bulletin</i>
	저자	Liang, Zhitao; He, Mingfang; Fong, Wangfun; Jiang, Zhihong; Zhao, Zhongzhen	Kim, Seung-Jin; Jung, Jin Young; Kim, Ha Won; Park, Taesun
	게재년도	2008	2008
	관련성(%)	10%	5%
	유사점	백운풀을 대상으로한 연구	AMPK관련 연구
	차이점	항비만관련성 없음	식물대상 연구이나 백운풀과 무관

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미.
 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미.
 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석.

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 비만/당뇨 제품생산 및 시장 현황

(단위: 백만원)

년도	(2009년)		(2013년) ^a 개별인증 완료 및 시판 시점	(2015년) 기능성 식품 시판 후 2년
	한국시장규모 ¹	당뇨	217,000	347,000
비만		11,700	187,000	243,000
합계		228,700	534,000	694,000
년도	(2006년)		(2007년)	(2008년)
수출규모	-		-	-
수입규모 ³	104,000		244,400	275,600

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황

년도	(2009년) 현재년도		(2013년) ^a 개별인증 완료 및 시판 시점	(2015년) 기능성 식품 시판 후 2년
	세계시장규모 ²	당뇨	297억 달러	475억 달러
비만		18억 달러	28억 달러	37억 달러
합계		315억 달러	503억 달러	655억 달러

: 국내외 시장규모의 산정에는 대사질환으로 비만에 대부분 수반되는 당뇨 시장 규모를 합산하였음. 이는 AMPK 활성화물질의 효능이 비만 뿐 아니라 당뇨치료 및 개선에도 우수한 효과가 있기 때문임.

¹비만/당뇨 국내시장규모는 IMS 1Q, IMS 4Q, 2002 KITI 재구성을 통한 한국기술거래소 추정자료 (2005) 및 데이코산업연구소(제품별/업체별 시장규모총람 2002)에 근거하였으며, 년 평균 성장률 15%로 설정.

²비만/당뇨 세계시장규모는 (Source: Scrip Reports Obesity & Metabolic Syndrome April 2005) 참조하였으며, 년 평균 성장률 15%로 설정.

³비만/당뇨 수입규모는 수입비만치료제 3종 및 경구혈당강하제원료 8종 주성분수입액 자료(원료추정비 25%)의 합산을 근거로 작성. 데이코산업연구소(제품별/업체별 시장규모총람, 2002) 및 한국기술거래소 추정자료(2005)를 참조.

^a본 연구과제는 3년으로 하고 있어서 2012년에 완료되나, 기능식품으로서 개별인증을 받기 위해서는 약 1년간의 인체시험 및 행정적 절차를 거쳐야 하므로 이런 기간을 포함한다면 2013년에 개별인증을 받아 시장에 출시될 수 있음. 한 2013년을 개발종료 후 1년으로 설정하였음.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

(1) 산업화 방향 (제품의 특징, 대상 등)

(가) 농가 소득 확대를 위한 백운풀 가공 판매.

- ① AMPK 활성화 성분의 효능을 중심으로 한 과학적 근거를 바탕으로 백운풀 자체를 다양한 형태의 다류 및 식품으로 가공하여 재배 농가 소득 확대.
- ② AMPK 활성화 성분이 강화된 추출물을 기능성 식품으로 제조하기 위한 원료 생산을 통한 재배 농가 소득 증대.

(나) 백운풀 추출물의 체지방 저하/혈중 지질저하/혈당조절용 식품으로 다양한 형태 제품 제조를 통한 신규 소득 창출.

- ① 다양한 형태의 기능성 식품 제조.
- ② 다양한 형태의 기능성 음료 제조.
- ③ 기타 복합기능성 식품 및 음료 제조.

(2) 산업화를 통한 기대효과

(단위: 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	15,000	22,500	30,000	45,000	60,000	172,500
경제적 파급효과	3,000	4,500	6,000	9,000	12,000	34,500
부가가치 창출액	2,000	4,000	6,000	12,000	18,000	42,000
합 계	20,000	31,000	42,000	66,000	90,000	249,000

1차년도는 개별인증 획득에 따른 기능성 식품 판매 시점인 2013년을 1차년도로 설정함.

- ※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치.
- ※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치.
- ※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치.

5. 3P (특허, 논문, 제품) 분석을 통한 연구추진계획

가. 특허분석 측면

- (1) 기존 특허는 주로 AMPK 활성화 물질로서 인위적으로 합성된 저분자 화합물 분야에 치중되어 있으며 천연물 성분은 거의 특허 검색이 되지 않고 있음. 따라서 본 연구에서는 천연물을 중심으로 AMPK 활성화 성분 연구를 추진하여 백운풀 추출물 자체의 효능을 중심으로 한 용도(비만 및 관련 대사질환) 특허를 국내외에 출원할 예정임.
- (2) 또한 개발기술에 대한 특허 보호 및 진입장벽을 높이기 위해 추출물에 포함된 AMPK 활성화 특정 단일 유효성분에 대한 물질특허 및 생산 공정 특허를 국내 및 국외에 함께 출원할 계획임.

나. 논문분석 측면

- (1) 기존 논문은 주로 AICAR라는 AMP analogue를 이용한 AMPK 활성화증가가 미치는 대사질환개선효과에 대한 논문들이 집중적으로 발간되고 있음. 이들은 주로 AMPK가 대사질환 작용 기작을 개선하는 기작에 대한 연구결과를 발표하고 있음.
- (2) 따라서 아직 구체적으로 AMPK 활성화 물질을 본격적으로 식물로부터 추출하여 이용하는 효과에 대한 논문은 미미하므로 백운풀 추출물의 AMPK 활성화 효과의 규명과의 이용에 대한 연구 개발은 경쟁성이 있음.

다. 논문분석 측면

- (1) 현재까지 인체에 적용가능 한 AMPK 활성화 물질은 식물 추출물 이든 또는 합성화합물 이든 공인된 경우는 없음.
- (2) 국외시장에서는 주로 대사질환치료용 신약개발을 위한 저분자 화합물의 개발이 대형 제약회사를 중심으로 활발히 이루어지고 있으나 아직 전임상을 성공적으로 통과한 후보물질은 없음. 또한 아직 식용가능 한 AMPK 활성화 물질도 시판되지 않고 있음.
- (3) 한편 국내에서는 제2세부과제 책임자인 경북대 허태린 교수가 개발한 돌외추출물이 AMPK 활성화 능력이 우수하여 이를 기능성 식품 개별인증을 받기 위한 전임상시험을 완료하고 현재 인체 시험에 진입해 있음.
- (4) 전체적 동향을 볼 때, AMPK 활성화물질은 비만 등 우수한 대사질환 개선 능력이 이론적으로는 이미 확인되었으나, 아직 제품의 생산 및 판매는 전 세계적으로 초기 단계임.
- (5) 본 연구팀은 이미 식물로부터 식용가능 한 AMPK 활성화물질 개발에 대한 기초연구부터 원료 추출 및 생산, 전임상 및 임상시험을 모두 수행한 경험이 있음. 따라서 본 연구팀은 그동안의 경험을 이용하여 AMPK 활성화 능력이 강한 성분을 함유하고 있음이 이미 예비실험 결과에서 확인된 백운풀 추출물을 이용하여 체지방 및 관련 대사질환 개선 소재를 개발하고, 이를 이용한 논가의 백운풀 원료 재배에 따른 농가 소득 확대 뿐 아니라 다양한 형태의 기능성식품을 제조하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 1차년도 (2010. 07. 01 - 2011. 06. 30)

가. 백운풀 에탄올 추출물의 AMP-activated protein kinase (AMPK) 및 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 활성 검증

(1) 추출물 제조

: 건조된 백운풀을 95% 에탄올을 이용하여 80°C에서 5시간 동안 2회 반복 환류추출한 후 필터하였다. 이를 감압농축하여 백운풀 에탄올 추출물을 얻었으며, L6 myotube cell에 처리하여 AMPK 및 ACC 활성화에 미치는 영향을 탐색하였다.

(2) 추출물의 활성검증

(가) 검증방법

: L6 myotube cell을 AMPK 및 ACC 활성검증에 이용하기 위하여 추출물 처리 10일 전에 세포를 분화시켰다. L6 myotube cell을 10% FBS α -MEM의 배지 상에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 12시간 이상 배양한 후, 세포가 petri dish에 정착된 것이 확인되면 2% FBS α -MEM으로 배지를 교체하여 배양하였다. 48시간 마다 배지를 교환해 주면서 세포를 10일 동안 배양한 뒤에 starvation을 유도하기 위하여 FBS를 포함하지 않은 α -MEM 배지를 처리해 주었다. 5시간 후, 백운풀 에탄올 추출물을 30 및 60 μ g/mL의 농도로 2시간 동안 처리하고 Western blotting을 위해 cell lysis buffer로 단백질 추출을 실시하였다. Western blotting은 p-AMPK와 p-ACC의 특이적 항체를 통해 진행되었으며, 양성대조군으로 2 mM metformin을 처리하였다.

(나) 검증결과

- ① 백운풀 에탄올 추출물을 처리한 구간에서 대조군에 비해 p-AMPK protein level이 증가한 것으로 나타났으며, 특히 30 μ g/mL 보다 60 μ g/mL의 농도로 처리해 준 구간에서 활성이 더 높은 것으로 확인되었다. 이는 곧 백운풀 에탄올 추출물이 rat smooth muscle cell에서 AMPK 활성화를 촉진할 수 있으며, 이와 함께 AMPK의 하위 메커니즘에 속하는 ACC의 인산화에도 영향을 줄 수 있다는 증거가 될 것으로 예상하였다.
- ② 백운풀 에탄올 추출물의 처리에 의해 AMPK의 하위 target 단백질인 ACC의 인산화도 효과적으로 증가되었다. AMPK에서와 동일하게 농도 의존적으로 ACC의 인산화를 유도하는 것을 알 수 있었으며, ACC가 AMPK에 이어 인산화가 이루어지게 되면 ACC는 불활성화가 되므로 지방산 산화의 생화학적 기작을 수행하여 항비만 치료 및 개선 효과가 있을 것으로 판단되었다 (그림 1).

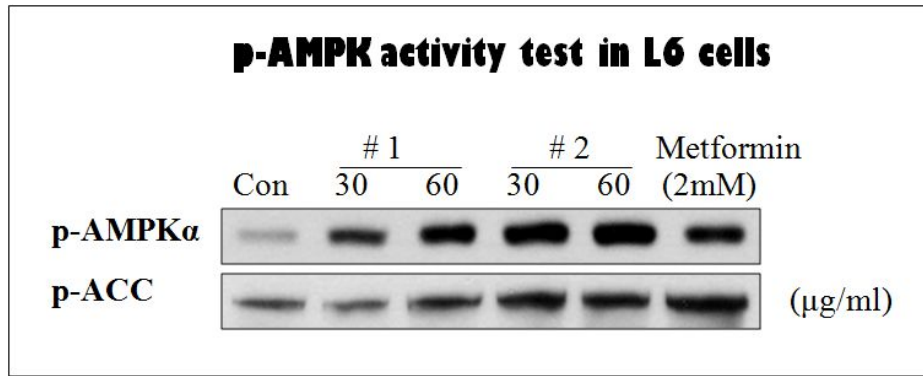


그림 1. 백운풀 에탄올 추출물이 AMPK 및 ACC 인산화에 미치는 영향.

나. 에탄올 농도에 따른 AMPK 활성 비교 및 최적 추출 용매조건 확립

(1) 에탄올 농도별 백운풀 추출물 제조

: 건조된 백운풀 시료를 50%, 75% 및 95% 에탄올로 각각 80°C에서 5시간 동안 2회 반복 환류추출하여 필터 후 감압농축 하여 3종의 백운풀 에탄올 추출물을 얻었다.

(2) 추출물의 활성검증

(가) 검증방법

: 3종의 백운풀 에탄올 추출물을 60 μg/mL의 농도로 L6 myotube cell에 처리한 후, Western blotting을 실시하였다. p-AMPK 및 p-ACC의 protein level을 관찰하여 에탄올 농도에 따른 AMPK 및 ACC의 활성을 검토하고 이에 대한 결과를 토대로 최적 추출 용매조건을 확립하였다. 양성대조군으로 2 mM metformin을 처리하였으며, 실험은 2회 반복 실시하였다.

(나) 검증결과

: Western blotting을 실시한 결과, 백운풀을 95% 에탄올로 추출한 구간에서 가장 강한 AMPK 및 ACC의 인산화 활성이 관찰되었다. 95% 에탄올 추출물의 효과는 양성대조군인 metformin을 처리한 구간과 비슷한 수준을 나타냄을 확인할 수 있었으며, 이는 2회 실험 모두에서 동일하게 나타났다. 따라서 백운풀 내의 항비만 활성을 나타내는 활성 화합물은 95% 에탄올로 추출하였을 때 가장 효율적으로 추출되는 것으로 판단되었으며, 후속실험에서 95% 에탄올 추출물을 사용하기로 결정하였다 (그림 2).

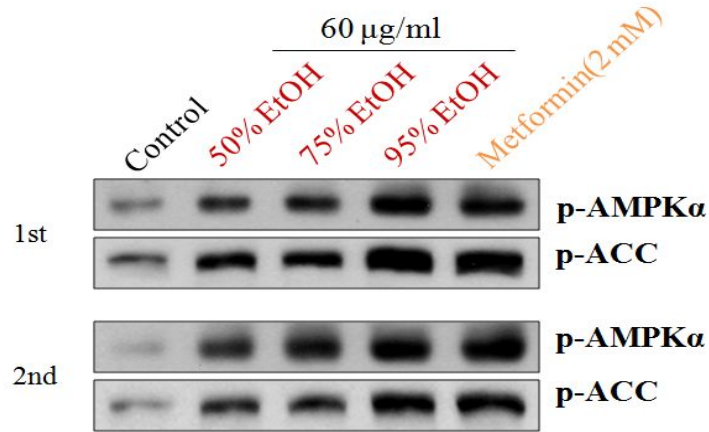
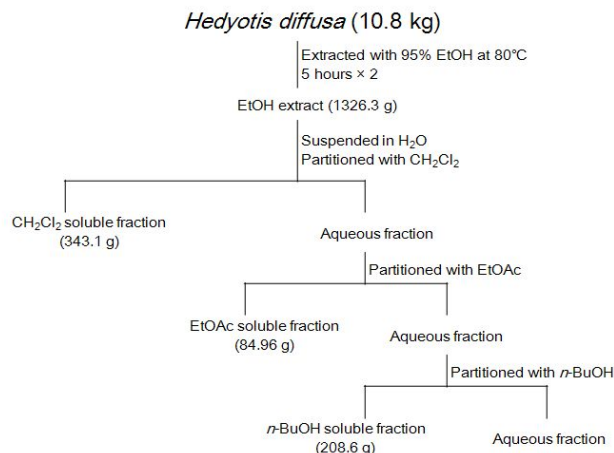


그림 2. 에탄올 농도별 백운풀 추출물의 AMPK 및 ACC 인산화에 미치는 영향.

다. 백운풀의 추출, 분획, 지표성분 분리 및 구조동정

(1) 추출 및 분획

: 백운풀로부터 AMPK 활성성분을 탐색하기 위하여 건조된 백운풀 10.8 kg을 최적 추출용매 조건으로 결정된 95% 에탄올로 80°C에서 2회 반복 환류추출 하였다. 에탄올 추출액을 필터 후 감압농축하여 1326.3 g의 백운풀 에탄올 추출물을 얻을 수 있었으며, 디클로로메탄 (CH_2Cl_2), 에틸아세테이트 (EtOAc) 및 수포화 부탄올 ($n\text{-BuOH}$) 등의 유기용매를 이용하여 순차적으로 분획하였다. CH_2Cl_2 층은 포화 NaCl 용액으로 back washing한 후, 무수 Na_2SO_4 로 탈수하고 감압농축하여 CH_2Cl_2 가용성 분획 343.1 g을 얻을 수 있었다. 또한 EtOAc층과 $n\text{-BuOH}$ 층에 대해서도 탈수 및 감압농축을 실시하여 EtOAc 및 $n\text{-BuOH}$ 가용성 분획을 각각 84.96 g과 208.6 g을 얻었다 (Scheme 1).



Scheme 1. 백운풀의 추출 및 분획과정.

(2) 분획별 활성검증

(가) 검증방법

: L6 myotube cells에 백운풀 에탄올 추출물로부터 얻은 CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O 가용성 분획을 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 각각 처리하여 Western blotting을 실시한 후, p-AMPK 및 p-ACC의 protein level의 변화를 관찰하였다.

(나) 검증결과

: 처리한 4종의 분획 중 CH_2Cl_2 및 EtOAc 가용성 분획에서 뚜렷한 AMPK 인산화 활성이 관찰되었으며, 특히 CH_2Cl_2 가용성 분획은 양성대조군인 2 mM metformin과 유사한 정도의 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 또한 EtOAc 가용성 분획의 경우, ACC의 인산화도 효과적으로 촉진하는 것으로 나타났다 (그림 3). 따라서 CH_2Cl_2 및 EtOAc 가용성 분획에 항비만 활성을 가지는 화합물들이 포함되어 있을 것으로 판단되어 추가적인 분리과정을 진행하였다.

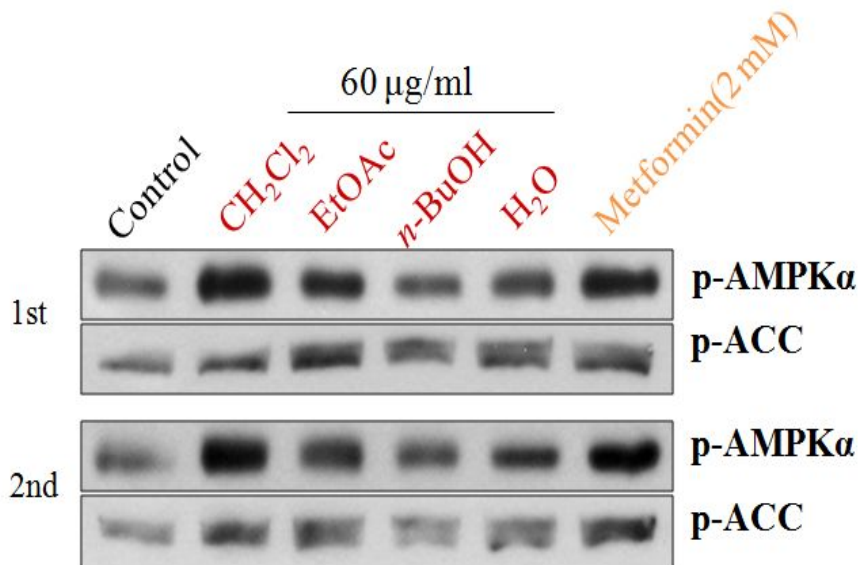
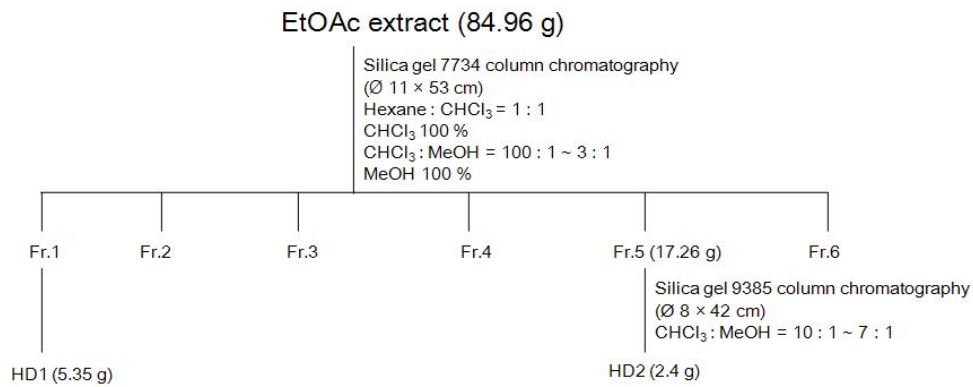


그림 3. L6 myotube cells에서 백운풀 분획별 추출물의 AMPK 및 ACC 인산화 효과.

(3) 분획별 지표성분 분리

(가) EtOAc 가용성 분획

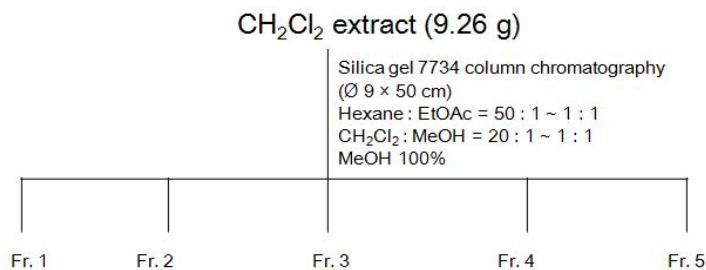
: EtOAc 가용성 분획 (84.96 g)을 대상으로 Silica gel 컬럼 크로마토그래피 (\varnothing 11×53 cm)를 실시한 결과, 총 6개의 fraction을 얻을 수 있었으며 이들 중 Fr. 1로부터 5.35 g의 HD1을 분리할 수 있었다. 또한 Fr. 5 (17.26 g)에 대해 Silica gel 컬럼 크로마토그래피 (\varnothing 8×42 cm)를 재실시하여 HD2 (2.4 g)를 얻었다 (Scheme 2).



Scheme 2. EtOAc 가용성 분획에 대한 column chromatography 과정.

(나) CH_2Cl_2 가용성 분획

① EtOAc 가용성 분획과 함께 AMPK 및 ACC 인산화 효과를 나타냈던 CH_2Cl_2 가용성 분획 (9.26 g)에 포함된 지표성분을 분리하기 위하여 Silica gel 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 그 결과, 총 5개의 fraction을 얻을 수 있었으며 이들에 대한 항비만 활성을 검증하였다 (Scheme 3).



Scheme 3. CH_2Cl_2 가용성 분획의 1차 컬럼 크로마토그래피.

② 백운풀 CH_2Cl_2 가용성 분획에 대한 1차 컬럼 크로마토그래피를 통해 얻은 5개의 fraction을 30 및 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 L6 myotube cell에 처리하여 Western blotting을 실시한 결과, Fr. 3에서 높은 AMPK 및 ACC 인산화 효과를 나타내었다. 따라서 Fr. 3에 포함된 활성 화합물을 분리하기 위하여 컬럼 크로마토그래피를 추가적으로 수행하였다 (그림 4).

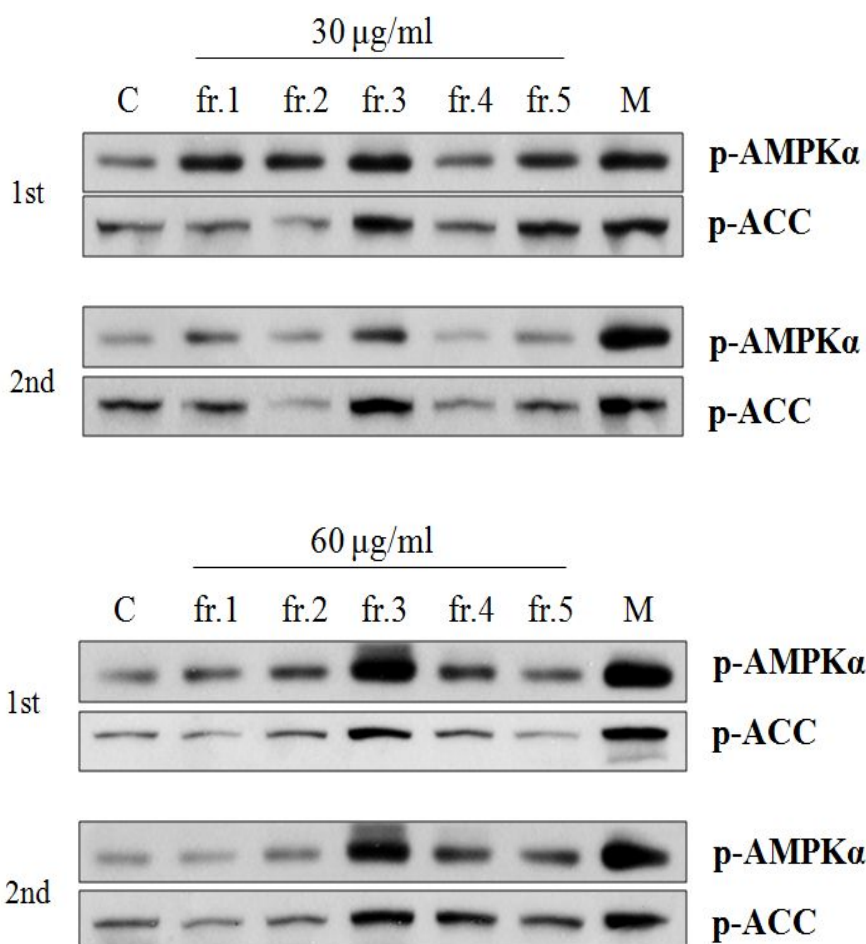
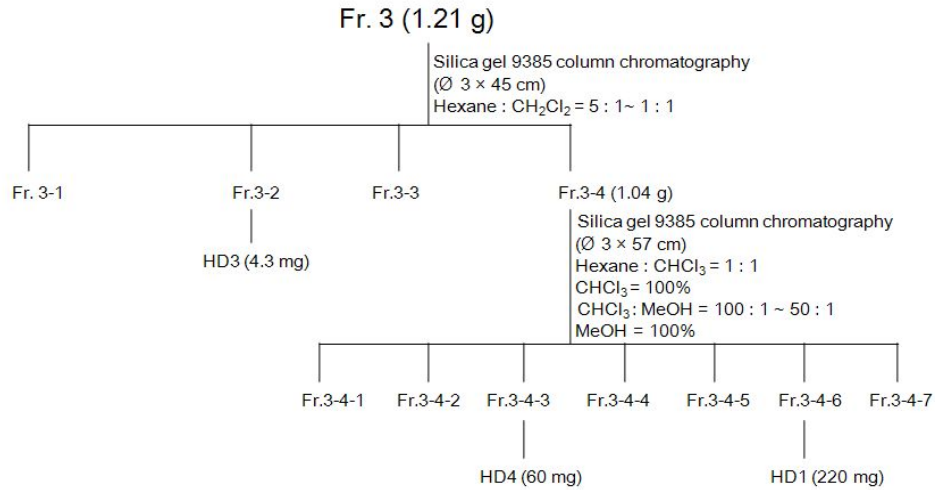


그림 4. 백운풀 CH_2Cl_2 가용성 분획의 fraction별 AMPK 및 ACC 인산화 효과.

③ CH_2Cl_2 가용성 분획으로부터 얻은 5개의 fraction 중 AMPK 및 ACC 인산화 효과가 가장 강했던 Fr. 3 (1.21 g)을 대상으로 Silica gel 컬럼 크로마토그래피 (\varnothing 3 \times 45 cm)를 실시하여 활성성분을 분리하고자 하였다. 그 결과, Fr. 3-2로부터 HD3 (4.3 mg)을 얻을 수 있었으며, 이어서 Fr. 3-4 (1.04 g)에 대해 Silica gel 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 HD4 (60 mg) 및 HD1 (220 mg)의 총 3종의 단일 화합물을 분리할 수 있었다 (Scheme 4).



Scheme 4. Fr. 3으로부터 화합물의 분리과정.

(4) 분리한 화합물의 구조동정

(가) HD1

- ① HD1는 TLC를 이용한 분석에서 UV를 흡수하지는 않았지만, 10% 황산을 이용한 정색반응에서는 붉은색으로 발색된 것으로 보아 triterpenoid, 또는 steroid계 화합물로 예상할 수 있었으며, 기존에 백운풀로부터 분리된 바 있는 대표적인 triterpenoid계 화합물인 ursolic acid와 Rf치를 비교해 본 결과 동일한 Rf치를 가지는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5).

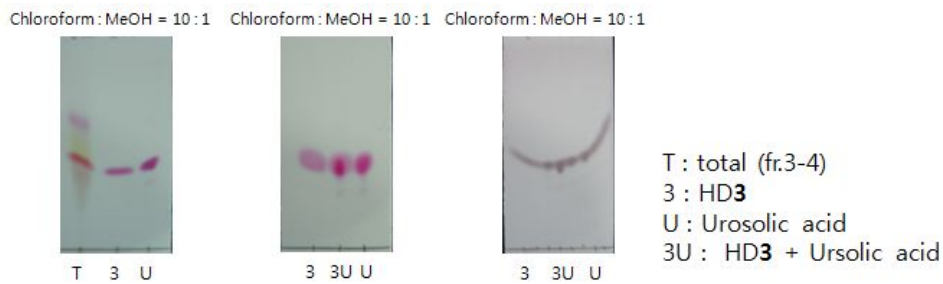


그림 5. TLC를 이용한 HD1과 ursolic acid 표준품의 Rf치 및 발색양상 비교.

- ② ^{13}C -NMR 분석결과, δ 178.67에서 carbonyl carbon이 관측되었으며, δ 138.54과 δ 124.93은 olefinic carbon에 의한 peak로 판단되었다. 또한 δ 77.17에서 hydroxyl group에 의한 carbon이 검출되는 특징을 나타내었다 (그림 6).

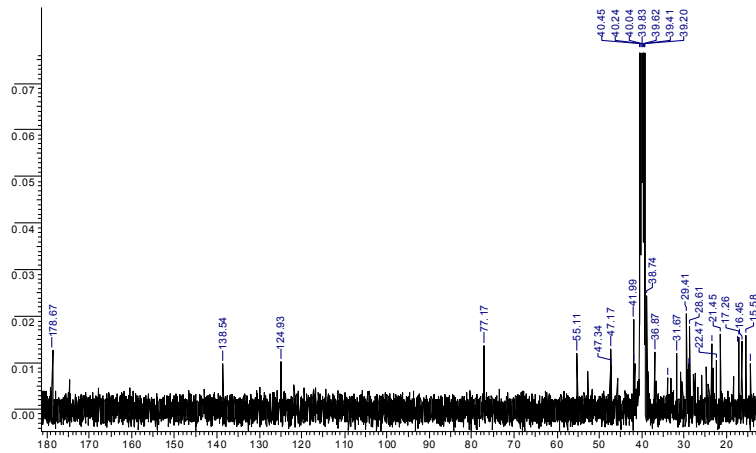


그림 6. HD1의 ^{13}C -NMT 스펙트럼 (DMSO- d_6).

③ ^1H 및 ^{13}C -NMR 결과는 아래와 같이 요약하였으며, NMR 및 Mass spectrum 분석 결과 (그림 7)를 문헌치¹⁻²⁾와 비교해 최종적으로 HD1은 ursolic acid로 구조동정 하였다 (그림 8). 또한 HPLC 분석을 통해 HD1은 97.18%의 순도를 가지는 것으로 확인되었다 (그림 9).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.67 (C-28), 138.54 (C-13), 124.93 (C-12), 77.17 (C-3), 55.11 (C-5), 52.71 (C-18), 47.34 (C-17), 47.17 (C-9), 41.99 (C-14), 38.85 (C-19), 38.77 (C-8, C-20), 38.74 (C-10), 38.55 (C-1), 36.87 (C-4), 36.66 (C-22), 33.04 (C-7), 30.76 (C-21), 28.61 (C-23), 27.88 (C-15), 27.32 (C-2), 24.14 (C-16), 23.62 (C-27), 23.19 (C-11), 21.45 (C-30), 18.36 (C-6), 17.39 (C-26), 17.26 (C-29), 16.45 (C-25), 15.58 (C-24).

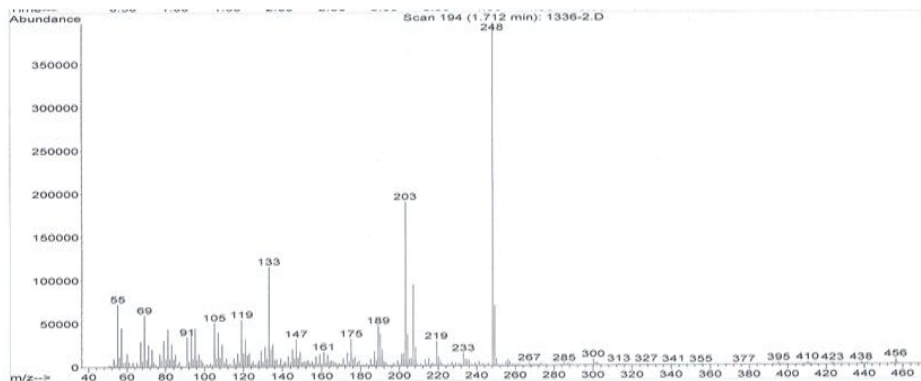


그림 7. HD1의 Mass 스펙트럼.

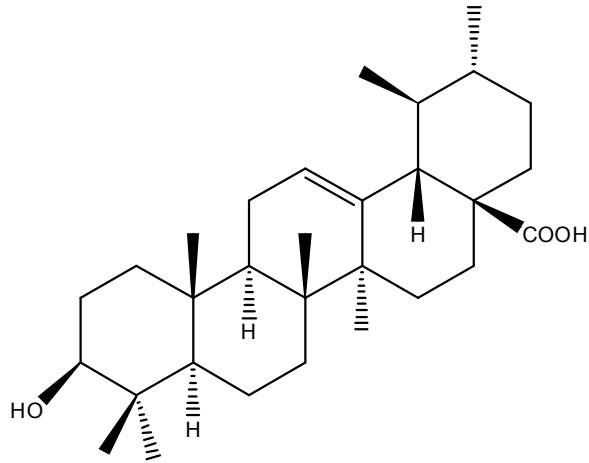


그림 8. HD1의 화학구조 (ursolic acid).

표 1. HD1의 순도확인을 위한 HPLC 분석조건.

Column	Merck chromolith RP-18e (100 x 4.6 mm)			
Detector	ELSD			
Temperature	25°C			
Injection volume	10 µl			
Mobile phase	Time (min)	Flow (ml/min)	Solvent A H ₂ O (%)	Solvent B MeOH (%)
	0	2	65	35
	1		65	35
	8		100	0
	10		100	0
	15		65	35

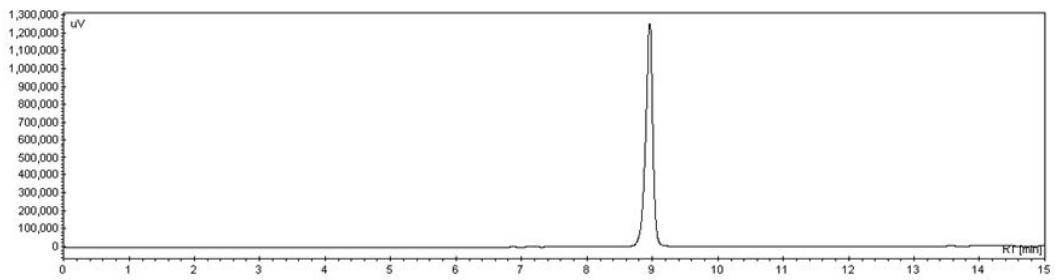


그림 9. HD1의 HPLC 크로마토그램.

(나) HD2

- ① EtOAc 가용성 분획의 Fr. 5로부터 얻어진 HD2에 대한 구조동정을 실시하였다. HD2는 10% 황산을 이용한 정성반응에서는 진한 청색으로 발색되었다.
- ② 화합물의 순도확인을 위한 HPLC 분석에서 2개의 peak가 관측되어 2개의 화합물이 혼합되어 있는 것으로 판단되었으며, 그 면적비율은 4 : 1로 나타났다 (그림 10). HPLC 분석조건은 표 2과 같다.

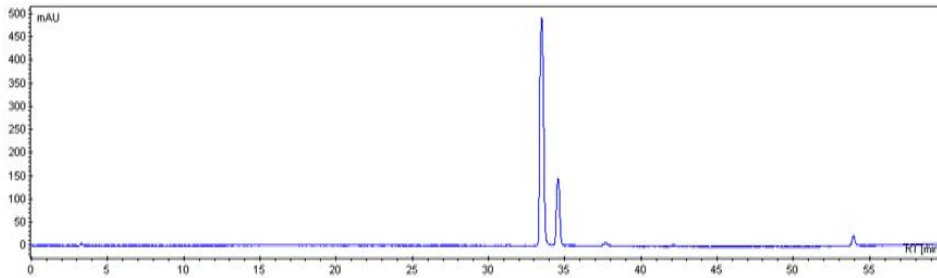


그림 10. HD2의 HPLC 크로마토그램.

표 2. 분리한 화합물의 순도확인을 위한 HPLC 분석조건.

Column	Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 X 250 mm, 5 μm)			
Detector	UV 280 nm			
Temperature	25°C			
Injection volume	10 μl			
Mobile phase	Time (min)	Flow (ml/min)	Solvent A (H ₂ O + 0.5% HOAc)	Solvent B (MeOH + 0.5% HOAc)
	0	0.9	95	5
	50		0	100
	55		0	100
	60		95	5

- ③ 이 혼합물은 증체로 분리가 되지 않아 이 상태로 ¹H 및 ¹³C-NMR 스펙트럼을 분석해 보았을 때, iridoid glucoside를 기본골격으로 하는 화합물로 판단되었으며 (그림 11, 12), MS 분석결과를 통해 화합물 구조 내에 coumaric acid가 있을 것으로 추측하였다 (그림 13).

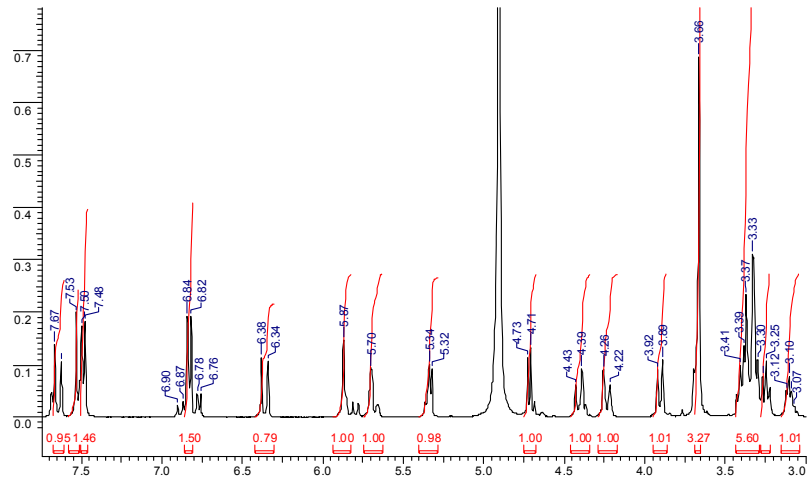


그림 11. HD2의 ^1H -NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

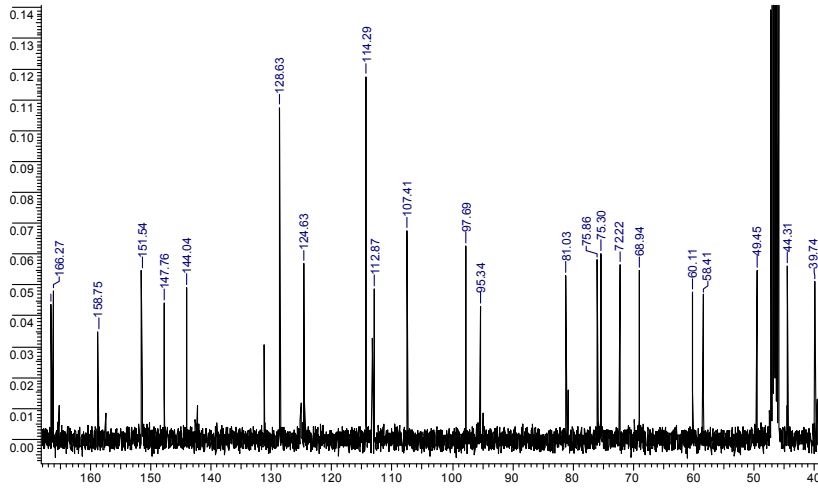


그림 12. HD2의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 (CD_3OD).

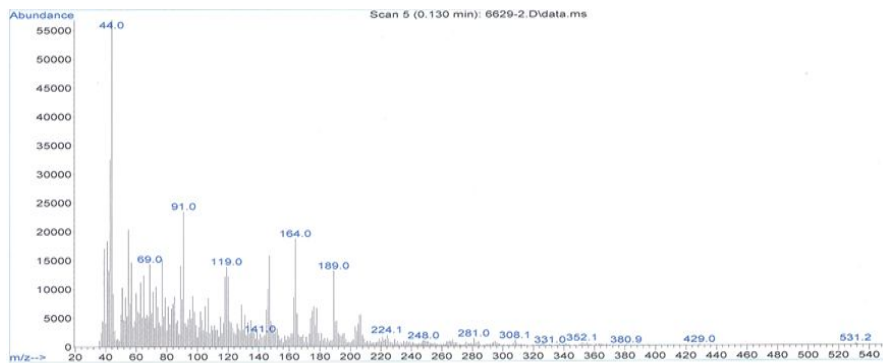


그림 13. HD2의 Mass 스펙트럼.

④ HD2 혼합물 중 major compound에 대한 NMR 분석결과는 아래와 같이 요약하였으며, 이를 문헌치³⁾와 비교하여 (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester로 구조동정 하였다 (그림 14).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.75 (1H, s, H-3), 7.65 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7'), 7.49 (2H, d, *J*=8 Hz, H-2'' and H-6''), 6.83 (2H, d, *J*=8 Hz, H-3'' and H-5''), 6.36 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8'), 5.87 (1H, m, H-7) 5.70 (1H, m, H-6), 5.32 (1H, d, *J*=6 Hz, H-1), 4.72 (1H, d, *J*=8 Hz, H-1'), 4.42 (1H, d, *J*=16 Hz, H-10), 4.24 (1H, d, *J*=16 Hz, H-10), 3.91 (1H, d, *J*=12 Hz, H-6'), 3.66 (1H, m, H-6'), 3.66 (3H, s, H-12), 3.27-3.43 (4H, m, H-2', H-3', H-4' and H-5'), 3.235 (1H, d, *J*=6 Hz, H-5) 3.095 (1H, m, H-9).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 166.52 (C-11), 166.27 (C-9'), 158.75 (C-4'), 151.54 (C-3), 147.76 (C-8), 144.04 (C-7'), 128.63 (C-2' and C-6'), 124.65 (C-1'), 114.29 (C-3' and C-5'), 113.25 (C-8'), 107.41 (C-4), 97.69 (C-1''), 95.34 (C-1), 81.03 (C-6), 75.86 (C-3''), 75.30 (C-5''), 72.22 (C-2''), 68.94 (C-4''), 60.11 (C-6''), 58.41 (C-10), 49.45 (C-12), 44.31 (C-9), 39.74 (C-5).

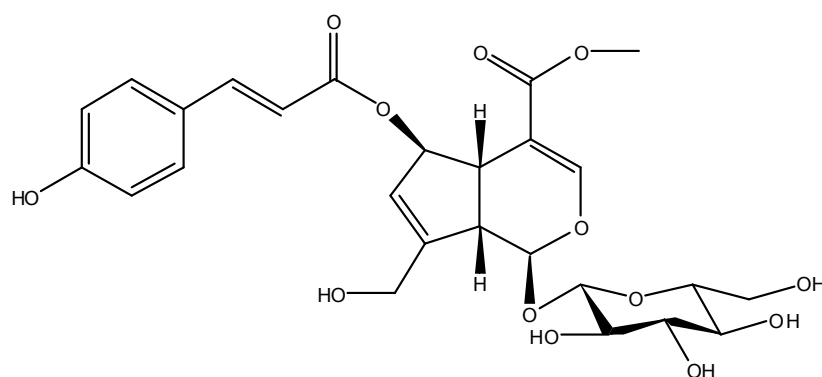


그림 14. HD2 major compound의 화학구조 [(*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester].

⑤ 한편, 이 화합물은 major compound를 분리하여도 곧바로 두 개의 peak로 변형 된다는 사실과, olefin 부분구조를 가지고 있다는 점, 그리고 *cis*와 *trans*-configuration은 열이나 빛 에너지에 의해 상호 전환이 가능하다는 사실로 미루어 구조 중 coumaric acid moiety의 이중 결합이 분리 과정 중 *cis*와 *trans*로 상호 전환하고 있는 것으로 생각되었다.

- ⑥ 특히, $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 (*E*)-6-*O-p*-coumaroyl scandoside methyl ester 의 δ 7.65와 δ 6.36의 특징적인 coupling constant (16 Hz)와 minor signal의 δ 6.89와 δ 5.80의 coupling constant (12 Hz) 값을 보이는 것으로 유추해 볼 때, C-7'와 C-8'에서 입체적인 *trans* 및 *cis* 구조를 가질 것으로 예상되어 이를 확인하기 위한 추가적인 실험을 수행하였다 (그림 15).

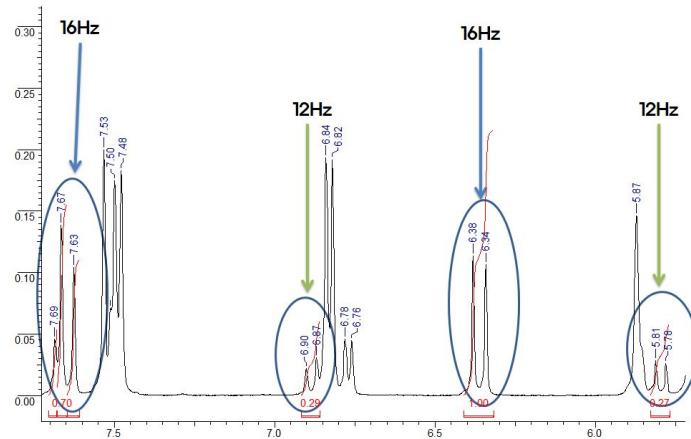


그림 15. HD2의 특징적인 coupling constant.

- ⑦ 분리한 HD2를 메탄올 (MeOH)에 녹인 후, 시계접시 위에 두고 clean bench 내에서 UV254 lamp를 켜 상태로 24시간 동안 방치하여 인위적인 UV 에너지를 주어 double bond의 *trans* 구조의 *cis*화를 유도하였다. 그 후 HPLC 및 $^1\text{H-NMR}$ 을 통해 minor compound인 *cis* 형태의 증가를 확인하였다. 그 결과, UV를 처리한 구간에서 minor compound의 peak 면적 비율이 13.92%에서 24.73%로 10.81% 증가하였으며, major compound의 비율도 이와 동일하게 감소하였다 (그림 16).

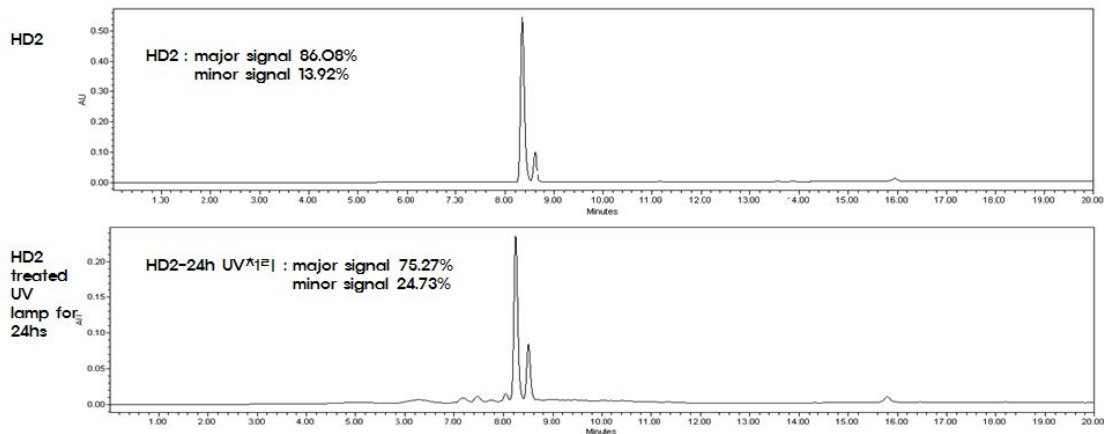


그림 16. UV에 의한 HD2 크로마토그램의 변화.

⑧ $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서도 major compound의 integral 대비 minor compound의 integral의 증가를 확인해 보았을 때, 약 2배가량 증가하는 양상을 보여 major compound와 minor compound의 비가 4 : 1에서 2 : 1로 증가되는 것으로 나타났다 (그림 17). 이를 통해 HD2의 minor compound는 (*Z*)-6-*O-p*-coumaroyl scandoside methyl ester로 확인되었으며 (그림 18), $^1\text{H-NMR}$ data는 아래와 같이 요약하였다.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.68 (2H, d, $J=8$ Hz, H-2'' and H-6''), 7.52 (1H, s, H-3), 6.85 (1H, d, $J=12$ Hz, H-7'), 6.77 (2H, d, $J=8$ Hz, H-3'' and H-5''), 5.86 (1H, m, H-7), 5.795 (1H, d, $J=12$ Hz, H-8'), 5.66 (1H, m, H-6), 5.36 (1H, d, $J=6$ Hz, H-1), 4.69 (1H, d, $J=8$ Hz, H-1'), 4.39 (1H, d, $J=16$ Hz, H-10), 4.23 (1H, d, $J=16$ Hz, H-10), 3.90 (1H, d, $J=12$ Hz, H-6'), 3.67 (1H, m, H-6'), 3.67 (3H, s, H-12), 3.21-3.42 (5H, m, H-5, H-2', H-3', H-4' and H-5'), 3.09 (1H, m, H-9).

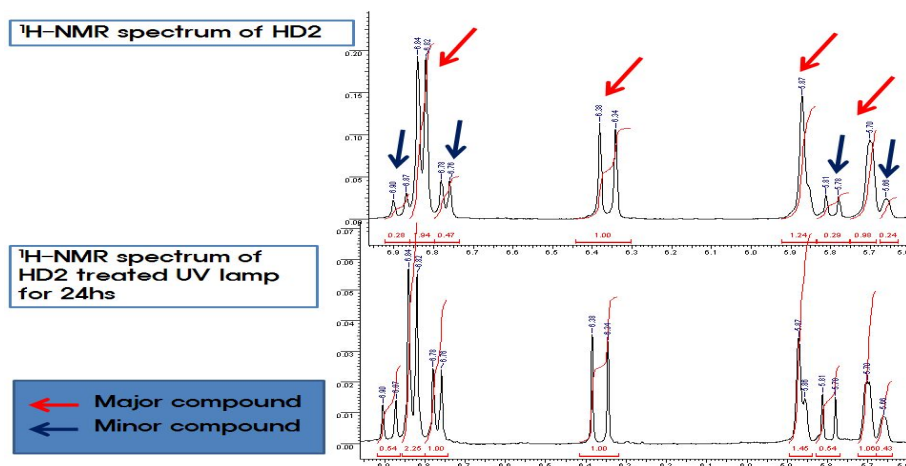


그림 17. UV에 의한 HD2의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼의 변화.

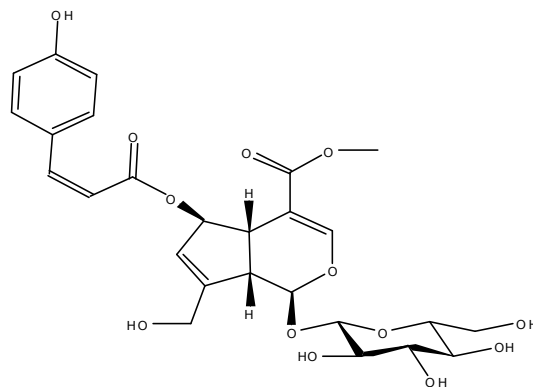


그림 18. HD2 minor compound의 화학구조 [(*Z*)-6-*O-p*-coumaroyl scandoside methyl ester].

(5) 분리한 화합물의 항비만 활성검증

(가) HD1 및 2에 대한 AMPK 및 ACC 활성검증

: 분리한 화합물 HD1, HD2에 대한 AMPK 및 ACC 인산화 효과를 10과 20 μ M의 수준에서 검증해 본 결과, HD1의 화합물을 처리한 구간에서는 강력한 AMPK 활성이 관찰되었다. 이와 함께 AMPK의 하위 메커니즘에 해당되는 ACC의 인산화도 효과적으로 촉진되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 HD2의 화합물을 처리한 구간에 대해서는 대조군과 유사한 수준의 protein band를 보이므로 AMPK 활성이 없는 것으로 판단되었다 (그림 19).

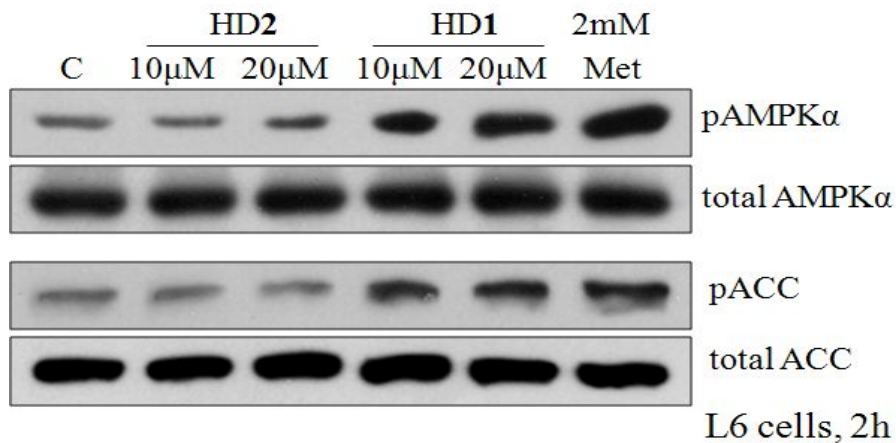


그림 19. 분리한 화합물 (HD1 및 2)에 대한 AMPK 및 ACC 활성검증.

(나) HD1 (ursolic acid)의 농도 및 처리 시간 의존적 AMPK 활성화

① 근육세포인 L6 cell에서 ursolic acid의 농도 의존적 AMPK의 활성화가 나타났다. 즉 L6 근육세포에 ursolic acid를 1, 2, 5, 10, 20 μ M의 농도로 2 시간 처리 하였을 때, AMPK α subunit의 인산화 정도는 처리 농도에 비례하여 증가 되었다. 이때, 양성대조군으로 과산화수소를 처리하여 AMPK α 의 인산화를 증가시켰다 (그림 20).

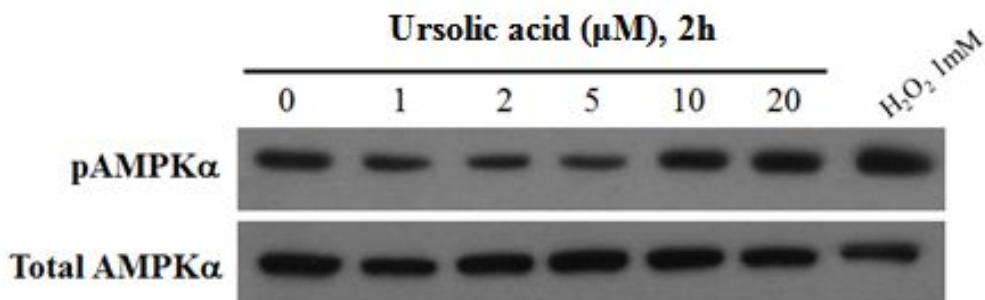


그림 20. Ursolic acid에 의한 농도 의존적 AMPK α 인산화 증가.

- ② 근육세포인 L6 cell에서 ursolic acid의 처리시간 의존적 AMPK의 활성화가 나타났다. 즉 L6 근육세포에 ursolic acid를 10 μ M/mL의 농도로 시간별로 처리하였을 때, AMPK α subunit의 인산화 정도는 2분에서 20분까지는 처리 시간에 비례하여 증가 되었으나 60분 및 120분에서는 오히려 활성 정도가 감소하였다. 이는 L6 근육세포에 처리된 ursolic acid의 안정성이 감소되어 나타나는 결과로 생각된다. 이때, 양성대조군으로 과산화수소를 처리하여 AMPK α 의 인산화를 증가시켰다 (그림 21).

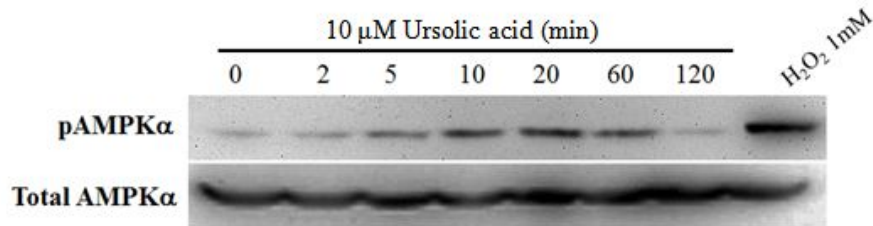


그림 21. Ursolic acid의 처리 시간에 따른 AMPK α 인산화 변화.

(다) AMPK 활성화에 대한 HD1 (ursolic acid)의 탈인산화 억제 가능성 조사

: Ursolic acid가 AMPK의 인산화를 증가시킬 수 있는 가능성은,

- 1) 인산화된 AMPK에 대하여 탈인산화를 일으키는 AMPK phosphatase의 활성 저해.
- 2) AMPK의 인산화를 수행하는 2종류의 AMPK upstream kinase [LKB1 및 Calcium/Calmodulin protein kinase kinase (CaMKK)] 중 CaMKK의 활성을 증가시키는 경우.
- 3) LKB1 upstream kinase의 세포질 분포를 증가시켜 세포질에 존재하는 AMPK의 인산화를 증가시키는 방법.

등의 3가지로 요약해 볼 수 있다. 이에 대한 확인을 위하여 아래의 실험들을 수행하였다.

- ① Ursolic acid가 AMPK의 인산화를 촉진하는 것이 AMPK 탈인산화효소인 AMPK phosphatase의 활성을 억제하는지 조사하기 위하여 HEK293 cell에 과산화수소를 처리하여 인위적으로 AMPK를 활성화시킨 cell lysate를 얻었다. 이 cell lysate를 인산화가 증가된 AMPK 및 AMPK phosphatase의 crude enzyme의 source로 사용하여 10 μ M 및 40 μ M의 농도로 10분 처리된 ursolic acid가 AMPK의 탈인산화를 억제하는지 조사하였다. 이 결과 ursolic acid는 40 μ M의 농도에서 AMPK의 탈인산화를 약하게 억제하였으나, AMPK phosphatase의 저해제로 알려진 A-769662에 비해서는 그 작용효과가 매우 낮게 나타났다 (그림 22).

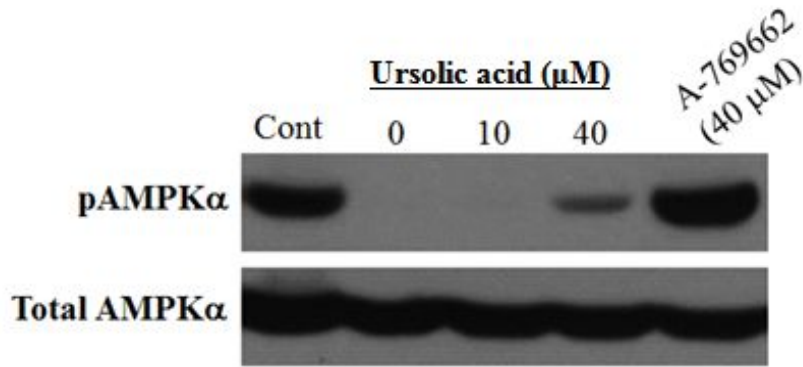


그림 22. Ursolic acid의 AMPK phosphatase 억제효능에 대한 조사.

② Ursolic acid CaMKK의 활성의 증가를 일으켜 AMPK의 인산화를 증가시키는지 확인하였다. 이를 위해 2 종류의 AMPK upstream kinase 들 중 LKB1이 결여된 세포인 HeLa cell에 ursolic acid를 처리하여 AMPK의 활성 증가가 일어나는지 확인하였으나 LKB1과 CaMKK가 모두 존재하는 L6 세포에서와는 달리 HeLa cell에서는 ursolic acid에 의한 AMPK인산화 증가가 나타나지 않았다. 또한 CaMKK의 활성 억제제인 STO-609를 ursolic acid와 함께 처리하였을 때 오히려 DMSO만 처리한 경우보다 AMPK의 인산화가 더욱 감소되었다 (그림 23). 이는 ursolic acid가 CaMKK보다는 LKB1을 통해 AMPK를 활성화시킨다는 사실을 의미한다.

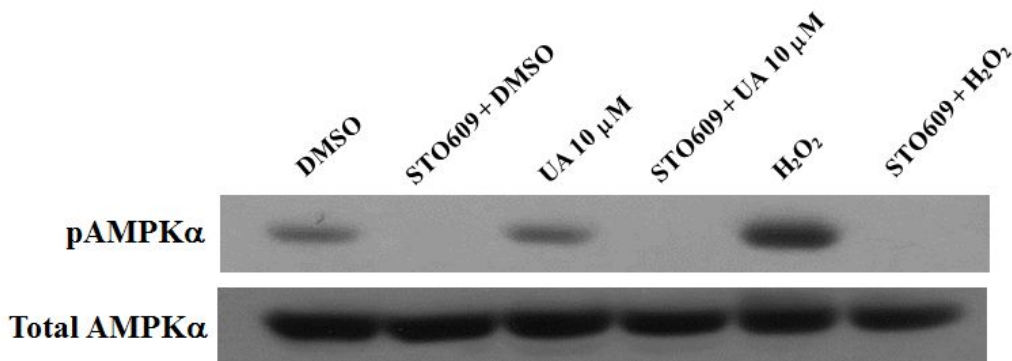


그림 23. Ursolic acid의 AMPK upstream kinase인 CaMKK의 활성화 가능성에 대한 조사.

③ LKB1이 결여된 HeLa cell에 제조한 pEGFP:LKB1 plasmid DNA를 transfection하여 ursolic acid가 핵내에 존재하는 LKB1의 세포질로 이동을 촉진하는 효능이 있는지 확인하여 보았다. 이 결과 ursolic acid가 처리된 세포에서 대조군과 마찬가지로 LKB1은 주로 핵에 머무르고 있음을 확인하여, ursolic acid에 의한 AMPK 인산화 증가는 LKB1의 세포질 이동증가에 의한 결과가 아님을 확인하였다 (그림 24). 향후 ursolic acid의 mitochondrial respiratory chain의 저해에 따른 AMP/ATP 비율 증가에 의한 AMPK 인산화 촉진에 대한 조사가 진행 될 예정이다.

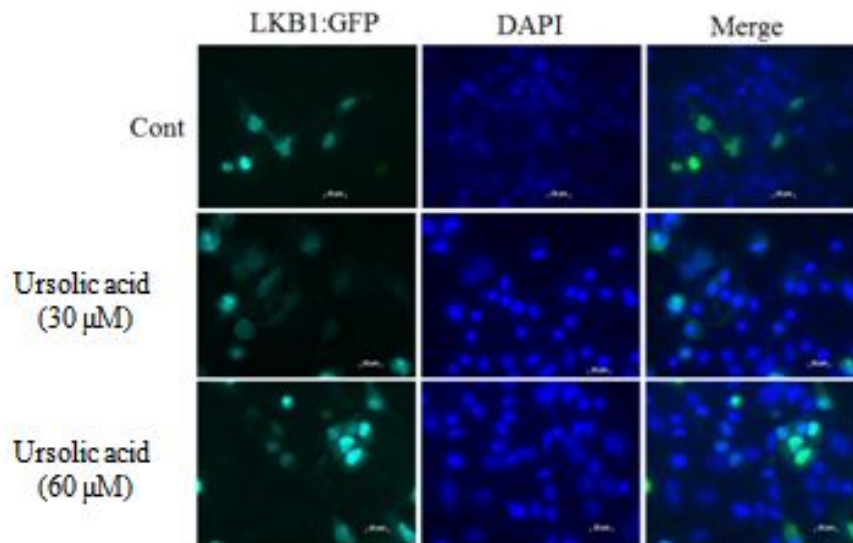


그림 24. Ursolic acid의 AMPK upstream kinase인 LKB1의 세포질 이동 촉진에 대한 조사.

2. 2차년도 (2011. 07. 01 - 2012. 06. 30)

가. 백운풀 추출물로부터 지표성분의 분리 및 구조동정

(1) CH₂Cl₂ 가용성 분획으로부터 분리된 지표성분의 구조동정

(가) HD3

- ① Fr.3-2에서 분리된 HD3은 황색분말 상태로 얻어졌다.
- ② ¹H-NMR 기기분석 결과, δ4.03에서 methoxyl group에 의한 integral 3의 특징적인 singlet peak가 관측되었으며, δ2.41에서 methyl group에 의한 3H의 siglet peak가 나타났다. 또한 δ6.75에서 integral 1의 hydroxyl group을 확인할 수 있었다 (그림 25).
- ③ ¹³C-NMR 스펙트럼에서 δ182.55와 δ182.44의 두 개의 특징적인 anthraquinone의 ketone 구조가 나타나는 것을 알 수 있었고, δ62.16과 δ16.34에서 나타난 peak로 각각 1개씩의 methoxyl group과 methyl group이 화합물 구조 내에 존재하고 있음을 짐작할 수 있었다 (그림 26).
- ④ HD3의 NMR data는 아래와 같이 요약하였으며, 이를 기존에 보고된 문헌⁴⁾과 비교하여 2-hydroxyl-1-methoxy-3-methylanthraquinone (digitoluein)으로 구조동정 하였다 (그림 27).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.24-8.26 (2H, m, H-5 and 8), 7.99 (1H, s, H-4), 7.75-7.77 (2H, m, H-6 and 7), 6.75 (1H, s, OH), 4.03 (3H, s, OCH₃), 2.41 (3H, s, CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 182.55 (C-9), 182.44 (C-10), 153.76 (C-3), 146.02 (C-4), 134.49 (C-10a), 133.77 (C-6), 133.67 (C-7), 132.98 (C-8a), 131.33 (C-2), 126.98 (C-5), 126.78 (C-8), 126.68 (C-1), 126.50 (C-9a), 123.52 (C-4a), 62.16 (OCH₃), 16.34 (CH₃).

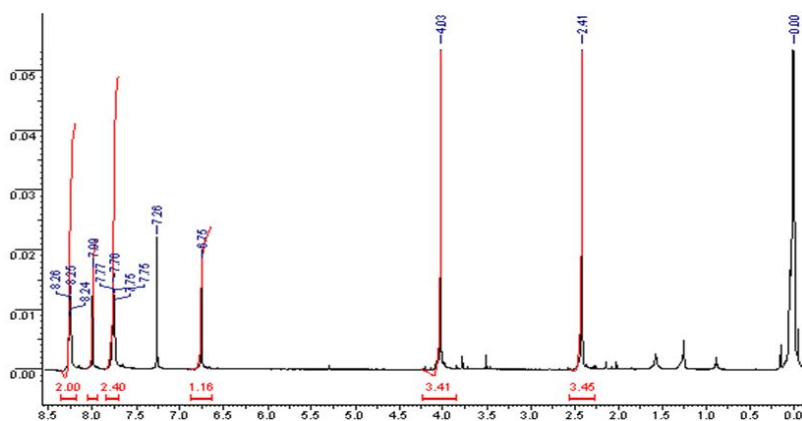


그림 25. HD3의 ¹H-NMR 스펙트럼 (400 MHz, CDCl₃).

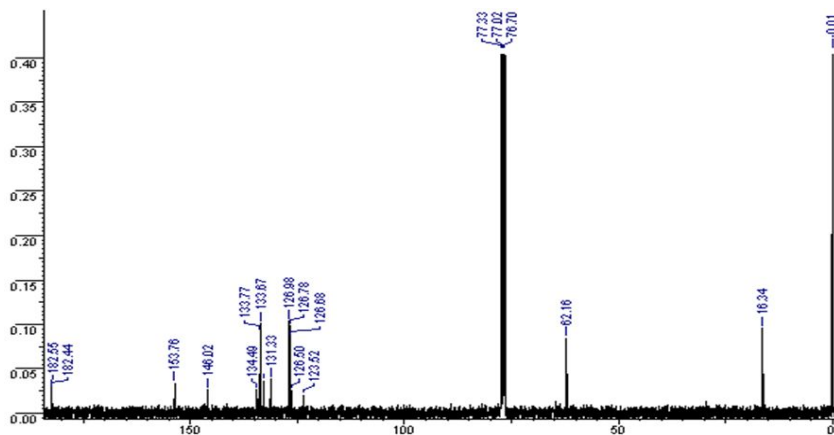


그림 26. HD3의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 (100 MHz, CDCl_3).

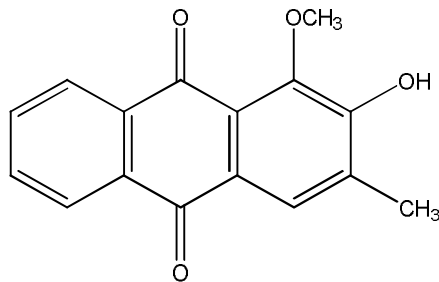


그림 27. HD3의 구조 (digitolutein).

(나) HD4

- ① Fr. 3-4-3에서 분리된 HD4는 황색분말 상태로 얻어졌다.
- ② ^1H -NMR 분석 결과, δ 2.29에서 methyl group에 의한 integral 3에 해당되는 singlet peak가 관측되었으며, δ 11.08에서는 integral 1의 hydroxyl group에 의한 peak를 관찰할 수 있었다 (그림 28).
- ③ ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 앞서 분리된 HD3과 같이 anthraquinone의 특징적인 2개의 ketone이 δ 182.95와 δ 181.77에서 관찰되었다. 또한 δ 16.57에서 나타난 peak에 의해 1개의 methyl group이 존재하는 것으로 확인된 반면, HD3과는 달리 methoxyl group에 의한 peak는 관측되지 않아 HD4 구조 내에는 methoxyl group이 포함되어 있지 않다는 것을 알 수 있었다 (그림 29).
- ④ HD4의 NMR data는 아래에 요약하였으며, 이를 기준에 보고된 문헌치⁵⁻⁶⁾와 비교하여 최종적으로 2-hydroxy-3-methylanthraquinone으로 구조동정 하였다 (그림 30).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 11.08 (1H, s, OH), 8.14-8.18 (2H, m, H-5 and 8), 7.97 (1H, s, H-4), 7.86-7.92 (2H, m, H-6 and 7), 7.55 (1H, s, H-1), 2.29 (3H, s, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 182.95 (C-10), 181.77 (C-9), 161.74 (C-3), 134.79 (C-7), 134.34 (C-6), 133.55 (C-8a), 133.53 (C-10a), 133.43 (C-4a), 132.34 (C-2), 126.92 (C-5), 126.89 (C-8), 125.36 (C-9a), 111.58 (C-4), 16.57 (CH_3).

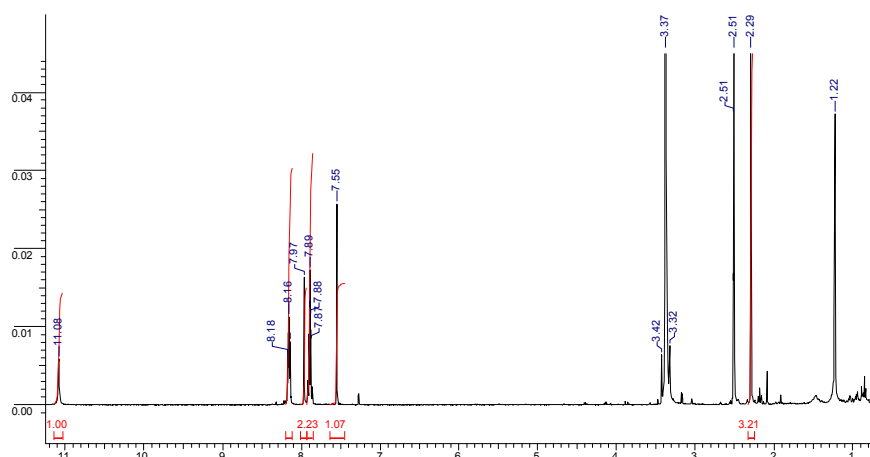


그림 28. HD4의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

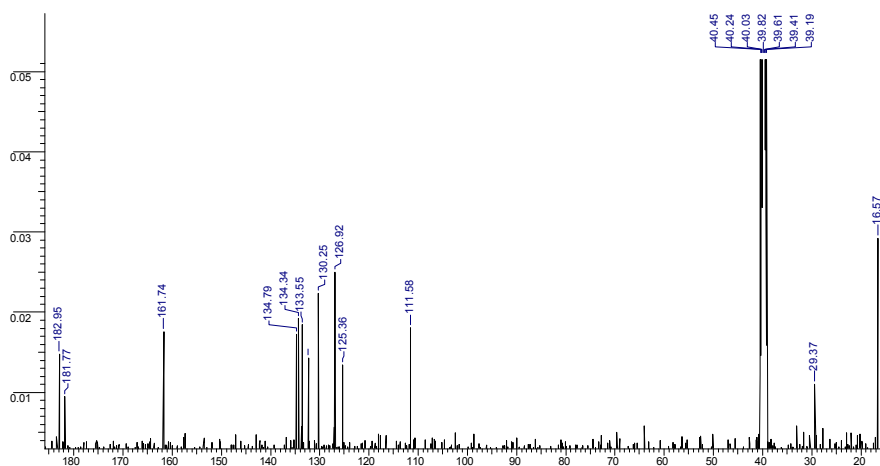


그림 29. HD4의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

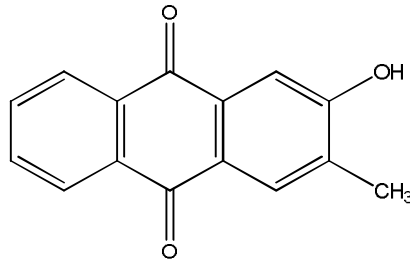
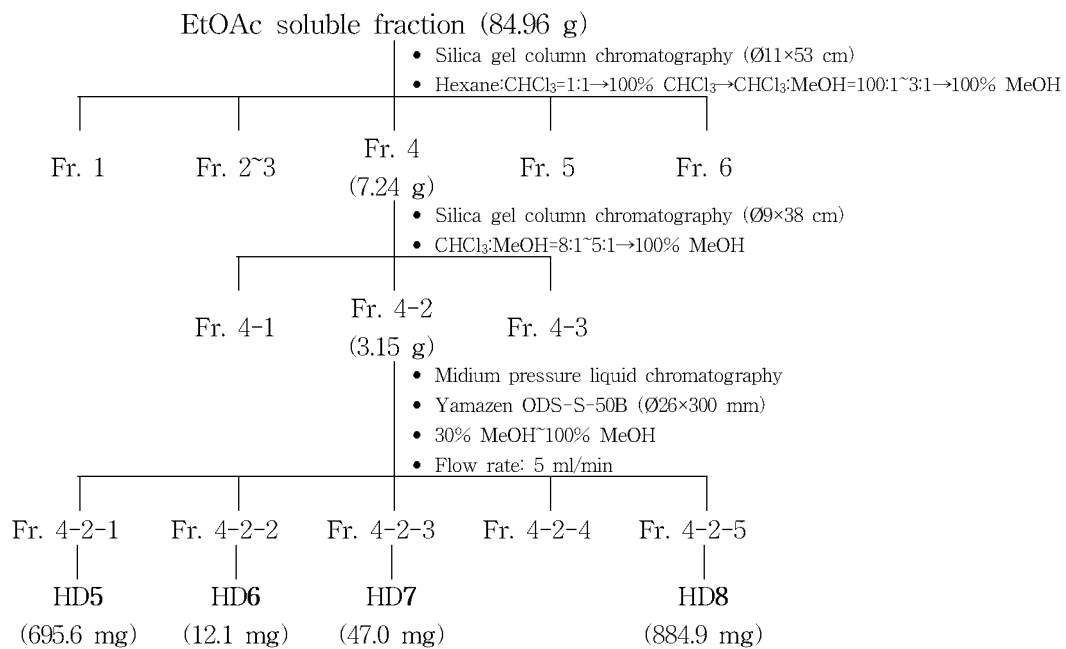


그림 30. HD4의 구조 (2-hydroxy-3-methylanthraquinone).

(2) EtOAc 가용성 분획으로부터 지표성분의 분리 및 구조동정

(가) 지표성분의 분리

: AMPK 및 ACC 인산화 촉진 효과를 나타낸 백운풀 추출물의 지표성분을 설정하고자 화합물의 분리를 시도하였다. EtOAc 가용성 분획 (84.96 g)을 대상으로 silica gel 컬럼 크로마토그래피 (Ø11×53 cm)를 실시한 결과, 총 6개의 fraction (Fr. 1~6)을 얻을 수 있었다. 이 중 Fr. 4에 대해 silica gel 컬럼 크로마토그래피를 재실시하여 3개의 subfraction (Fr. 4-1~4-3)을 얻을 수 있었으며, Fr. 4-2를 대상으로 MPLC를 이용한 물질 분리를 시도하였다. 그 결과, 총 5개의 fraction (Fr. 4-2-1~4-2-5) 중 4개의 fraction에서 단일 화합물로 분리되었음을 확인할 수 있었고 각각 HD5 (696.5 mg), HD6 (12.1 mg), HD7 (47.0 mg), HD8 (884.9 mg)으로 명명하였다 (Scheme 5).



Scheme 5. EtOAc 분획으로부터 HD5-8의 분리과정.

(나) 지표성분의 구조동정

① HD5

㉠ Fr. 4-2-1로부터 얻어진 HD5의 구조 동정을 위해 NMR 기기분석을 실시한 결과, $^1\text{H-NMR}$ 의 δ 3.26-4.72에서 peak가 관찰됨에 따라 당을 포함하고 있는 구조임을 예상할 수 있었으며, $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 δ 149.42, 143.26, 127.93, 105.2의 signal이 나타남에 따라 기본골격이 iridoid glucoside인 것으로 판단되었다.

㉡ 또한 $^1\text{H-NMR}$ 에서 δ 2.10에서 나타난 integral 3의 siglet으로 하나의 methyl기가 존재한다는 것을 짐작할 수 있었으며, $^{13}\text{C-NMR}$ 의 δ 171.71, 171.49에서 2개의 carbonyl carbon을 확인하였다 (그림 31, 그림 32). HD5의 NMR data는 아래와 같이 요약하였으며, 문헌치⁷⁾와의 대조로 asperuloside로 최종 구조동정하였다 (그림 33).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.34 (1H, d, $J=2$ Hz, H-3), 5.97 (1H, dd, $J=2$ and 1 Hz, H-1), 5.75 (1H, m, H-7), 5.60 (1H, dd, $J=8$ and 2 Hz, H-6), 4.78 (1H, dd, $J=16$ and 2 Hz, H-10), 4.72 (1H, d, $J=8$ Hz, H-1'), 4.70 (1H, dd, $J=16$ and 2 Hz, H-10), 3.96 (1H, dd, $J=12$ and 8 Hz, H-6a'), 3.93 (1H, dd, $J=12$ and 2 Hz, H-6b'), 3.71 (1H, m, H-5), 3.42 (1H, m, H-5'), 3.35 (1H, m, H-9), 3.34 (1H, m, H-4'), 3.32 (1H, m, H-3'), 3.26 (1H, dd, $J=9$ and 8 Hz, H-2'), 2.10 (3H, s, OCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 171.71 (C=O), 171.49 (C-11), 149.42 (C-3), 143.26 (C-8), 127.93 (C-7), 105.20 (C-4), 98.99 (C-1'), 92.37 (C-1), 85.44 (C-6), 77.28 (C-3'), 76.81 (C-5'), 73.59 (C-2'), 70.55 (C-4'), 61.80 (C-6a'), 61.04 (C-10), 44.23 (C-9), 36.45 (C-5), 19.45 (OCH_3).

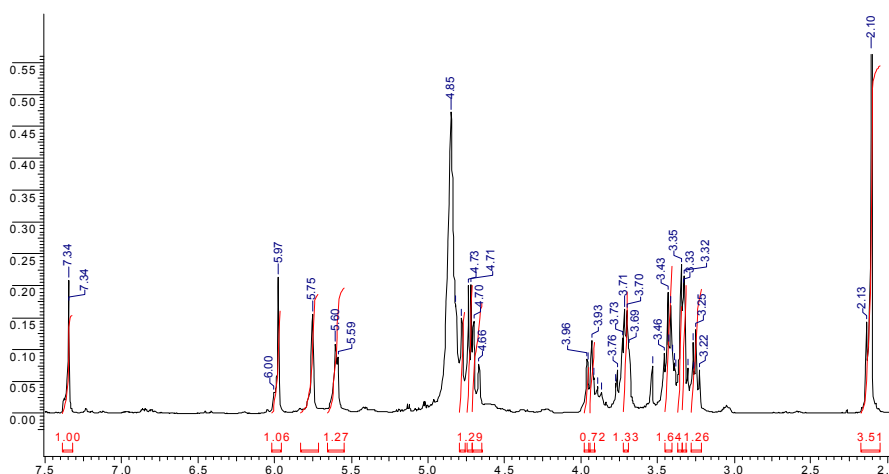


그림 31. HD5의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 (400 MHz, CD_3OD).

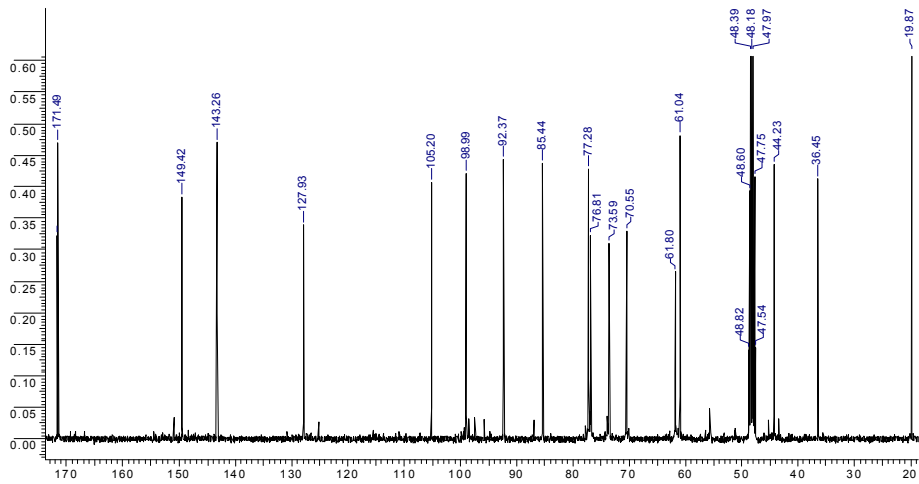


그림 32. HD5의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 (100 MHz, CD_3OD).

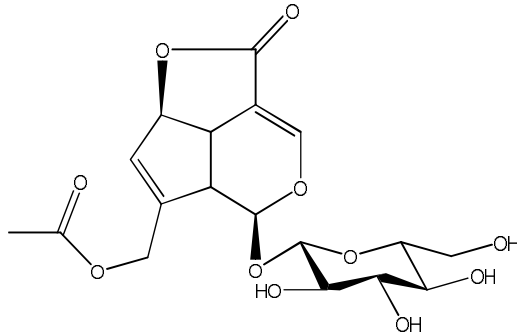


그림 33. HD5의 구조 (asperuloside).

② HD6

㉠ ^1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼에 나타난 peak들의 패턴으로 보아 HD5와 마찬가지로 iridoid glucoside를 기본골격으로 하는 화합물임을 알 수 있었다. ^1H -NMR의 δ 3.17부터 δ 3.40까지 multiplet의 signal로 보아 HD5와 마찬가지로 구조 내에 당을 포함하고 있을 것으로 판단되었지만, δ 3.73에서 integral 3의 siglet peak로 HD5와는 다르게 하나의 methoxyl group을 포함하고 있는 것으로 예상되었다 (그림 34).

㉡ ^{13}C -NMR에서는 δ 168.53에서 carbonyl carbon의 signal이 관측되었으며, ^1H -NMR에서 확인되었던 methoxyl group에 의한 peak가 δ 50.74에서 나타나고 있는 것을 볼 수 있었다 (그림 35). HD6의 NMR data는 아래와 같이 요약하였으며, 문헌치⁸⁾와의 대조를 통해 geniposide로 구조동정하였다. 또한 이번에 분리된 geniposide는 백운풀의 성분으로는 처음으로 보고되는 화합물인 것으로 확인되었다 (그림 36).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.53 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-3), 5.82 (1H, brd, H-7), 5.19 (1H, d, $J=8\text{Hz}$, H-1), 4.73 (1H, d, $J=8\text{ Hz}$, H-1'), 4.33 (1H, d, $J=16\text{ Hz}$, H-10b), 4.20 (1H, d, $J=16\text{ Hz}$, H-10a), 3.86 (1H, brd, H-6b'), 3.73 (3H, s, OCH_3), 3.65 (1H, m, H-6b'), 3.17-3.40 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', and 5), 2.84 (1H, dd, $J=8$ and 16 Hz , H-6b), 2.74 (1H, t, $J=8\text{ Hz}$, H-9), 2.12 (1H, dd, $J=8$ and 16 Hz , H-6a).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 168.53 (C-11), 152.35 (C-3), 143.79 (C-8), 127.3 (C-7), 111.53 (C-4), 99.28 (C-1'), 97.22 (C-1), 77.4 (C-5'), 76.83 (C-3'), 73.85 (C-2'), 70.51 (C-4'), 61.63 (C-6'), 60.42 (C-10), 50.74 (CH₃), 45.97 (C-9), 38.68 (C-6), 35.59 (C-5).

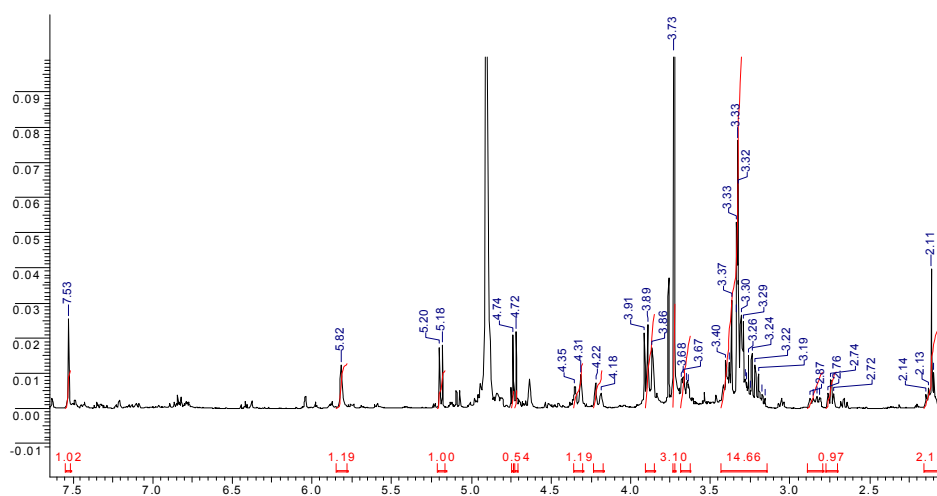


그림 34. HD6의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 (400 MHz, CD_3OD).

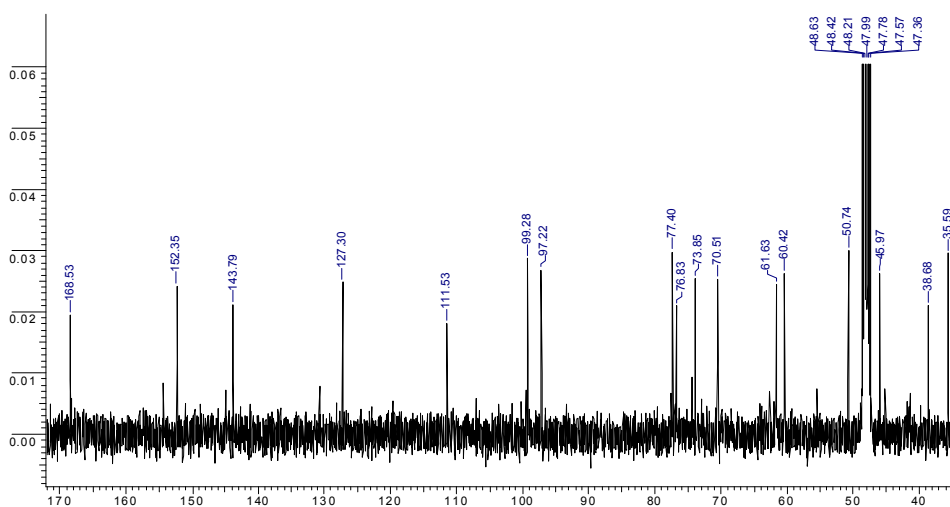


그림 35. HD6의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 (100 MHz, CD_3OD).

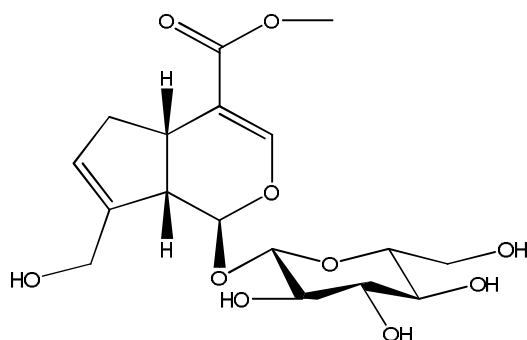


그림 36. HD6의 구조 (geniposide).

③ HD7

- ㉔ ^1H - 및 ^{13}C -NMR에서 나타난 peak의 패턴으로 볼 때 HD5 및 HD6과 같은 iridoid glucoside에 속하는 화합물임을 알 수 있었으며, ^1H -NMR 스펙트럼에서 δ 3.76에서 HD6과 동일한 integral 3의 singlet이 나타나 하나의 methoxyl group이 존재함을 확인하였다. 또한 δ 2.11에서는 HD5의 스펙트럼에서 관찰된 바 있는 integral 3의 singlet peak가 목격됨에 따라 하나의 methyl group에 의한 것으로 판단되었다 (그림 37).
- ㉕ ^{13}C -NMR에서는 δ 171.54 및 δ 168.33에서 2개의 carbonyl carbon에 의한 signal을 관찰할 수 있었으며, δ 50.88과 δ 19.77에서 각각 ^1H -NMR에서 확인 하였던 methoxyl group과 methyl group을 재확인할 수 있었다 (그림 38). HD7의 NMR data는 아래와 같이 요약하였으며, 이를 문헌치⁸⁾와 비교하여 최종적으로 HD7을 daphylloside로 구조동정하였다 (그림 39).

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.68 (1H, d, $J=2\text{Hz}$, H-3), 6.04 (1H, d, $J=2\text{ Hz}$, H-7), 5.08 (1H, d, $J=8\text{ Hz}$, H-1), 4.96 (1H, brd, $J=16\text{ Hz}$, H-10b), 4.82 (2H, m, H-6 and 10a), 4.74 (1H, d, $J=8\text{ Hz}$, H-1'), 3.88 (1H, dd, $J=2\text{ and }12\text{ Hz}$, H-6b'), 3.76 (3H, s, OCH_3), 3.64 (1H, dd, $J=4\text{ and }12\text{ Hz}$, H-6a'), 3.24-3.43 (4H, m, H-2', 3', 4', and 5'), 3.05 (1H, td, $J=2\text{ and }8\text{ Hz}$, H-5), 2.66 (1H, brt, $J=8\text{ Hz}$, H-9), 2.11 (3H, s, CH_3).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 171.54 (C=O), 168.33 (C-11), 154.38 (C-3), 144.96 (C-8), 130.79 (C-7), 107.10 (C-4), 100.27 (C-1'), 99.56 (C-1), 77.56 (C-3'), 76.85 (C-5'), 74.36 (C-6), 73.90 (C-2'), 70.54 (C-4'), 62.76 (C-10), 61.97 (C-6'), 50.88 (OCH_3), 45.21 (C-9), 41.39 (C-5), 19.77 (CH_3).

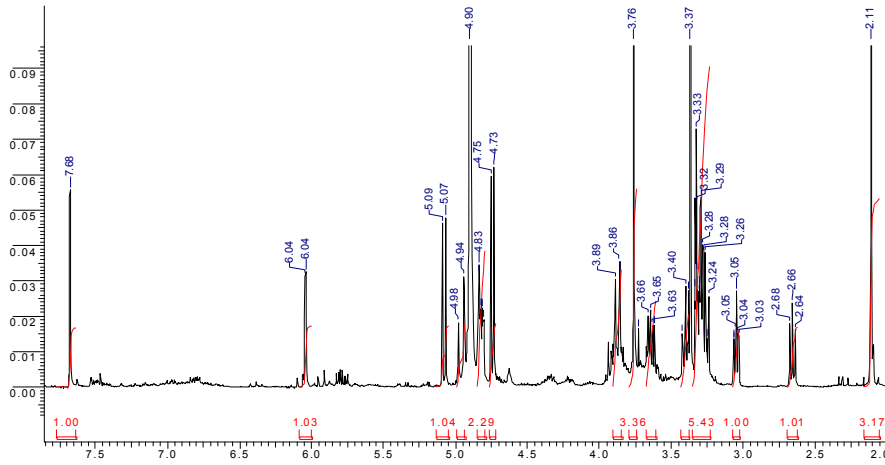


그림 37. HD7의 ^1H -NMR 스펙트럼 (400 MHz, CD_3OD).

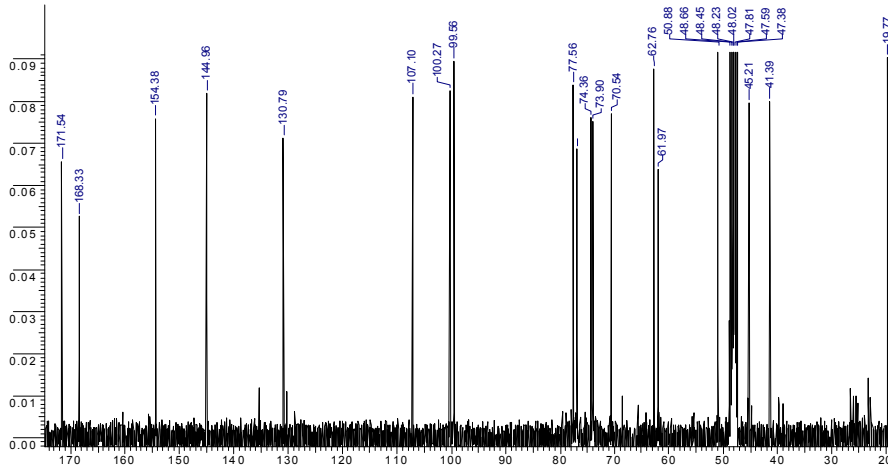


그림 38. HD7의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 (100 MHz, CD_3OD).

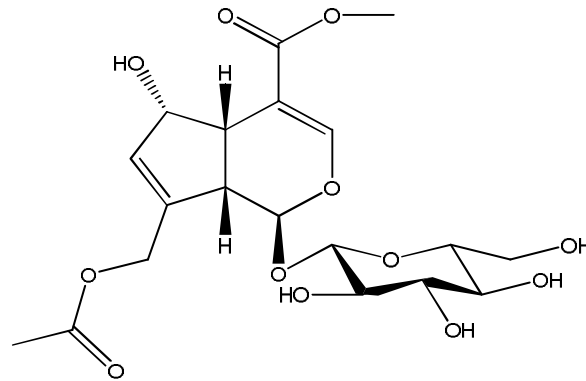


그림 39. HD7의 구조 (daphylloside).

④ HD8

- ㉠ 10% 황산을 이용한 정성반응에서는 진한 청색으로 발색되었다.
- ㉡ NMR 분석 결과, iridoid glucoside를 기본골격으로 하는 화합물인 것으로 판단되었지만 (그림 40, 그림 41), 유사한 구조의 화합물 2개가 혼합된 것으로 예상되어 HPLC 분석을 통해 HD8의 순도를 확인해 보기로 하였다.
- ㉢ 그림. 19에 나타낸 것과 같이 HD8 크로마토그램에서 2개의 peak가 1:4의 비율로 관찰되어 2개의 화합물이 혼재하고 있음을 확인하였다 (그림 42).
- ㉣ HD8의 NMR data를 문헌치⁹⁾와 대조하여 HD8내에 존재하는 major compound는 (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester로 동정하였으며, minor로 존재하는 compound는 (*Z*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester로 최종 구조동정하였다 (그림 43).

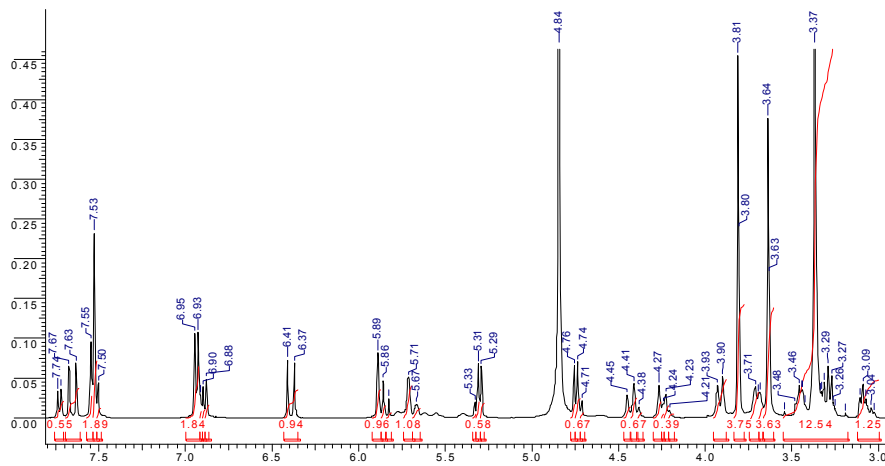


그림 40. HD8의 ¹H-NMR 스펙트럼 (400 MHz, CD₃OD).

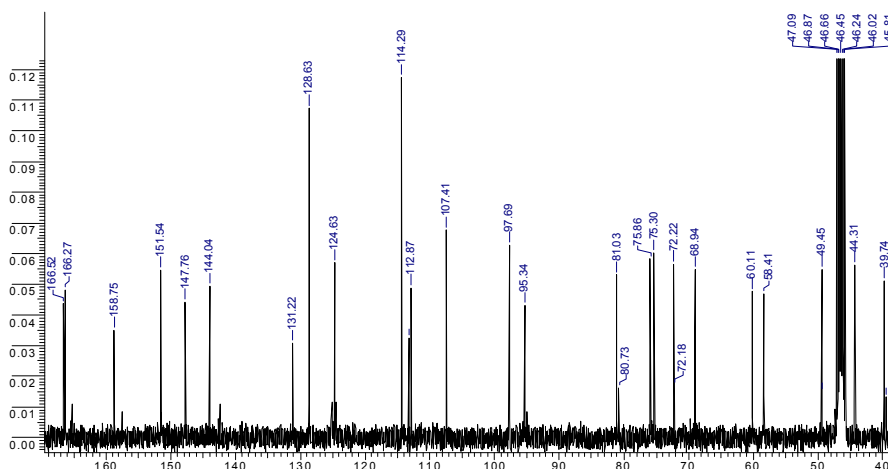


그림 41. HD8의 ¹³C-NMR 스펙트럼 (400 MHz, CD₃OD).

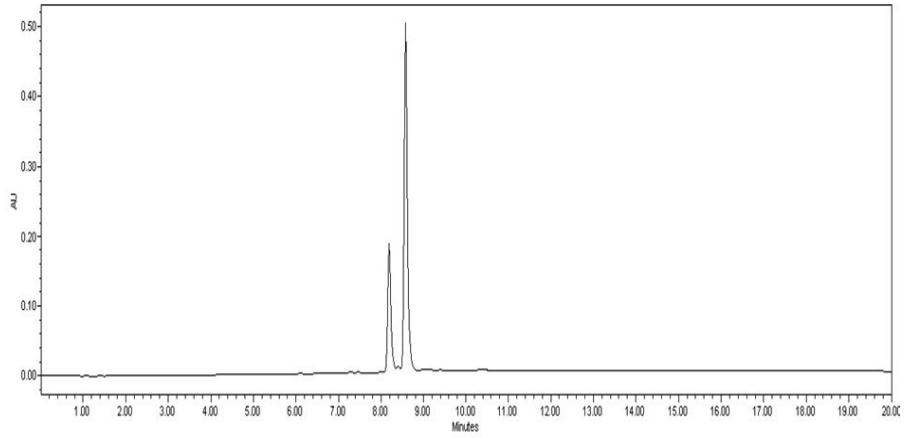


그림 42. HD8의 HPLC 크로마토그램.

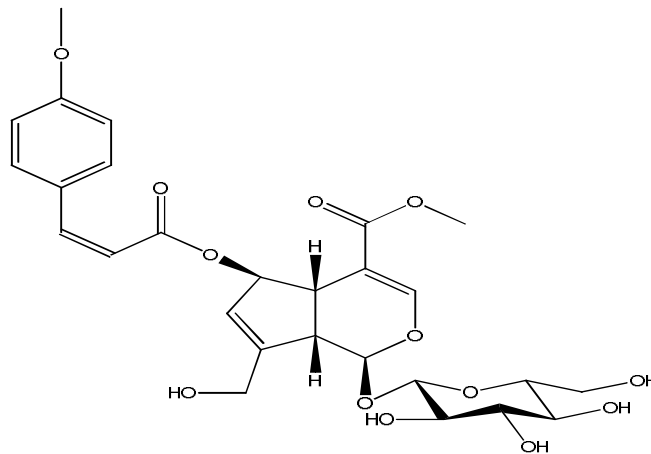
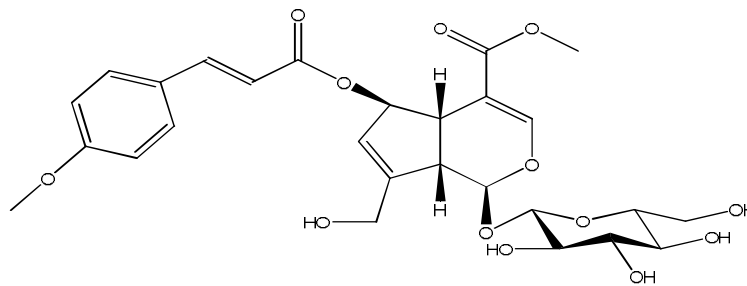


그림 43. HD8의 구조.

상: (*E*)-6-*O*-Methoxycinnamoyl scandoside methyl ester (major).

하: (*Z*)-6-*O*-Methoxycinnamoyl scandoside methyl ester (minor).

나. 백운풀 지표성분의 설정 및 분석법 개발

(1) 지표성분의 설정

(가) 본 연구를 통해 백운풀 추출물로부터 총 8종의 화합물을 분리 및 구조동정 하였으며, 이들은 각각 anthraquinone 2종, triterpene 1종, iridoid glucoside 5종으로 분류되었다.

(나) 분리된 8종의 화합물 중, 백운풀의 품질표준화를 위한 지표성분을 설정하고자 아래와 같은 조건을 충족시킬 수 있는 화합물을 탐색하였다. 그 결과, HD2 [(*E*)- and (*Z*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester], HD3 (digitolutein), HD4 (2-hydroxy-3-methylanthraquinone), HD8 [(*E*)- and (*Z*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester]을 지표성분으로 선정하게 되었다 (그림 44).

1. 대상식물을 대표할 수 있을 정도로 함유량이 높을 것
2. 대상식물로부터 분리가 용이할 것
3. 대상식물에 특이적인 화합물일 것
4. 분석방법이 간단할 것

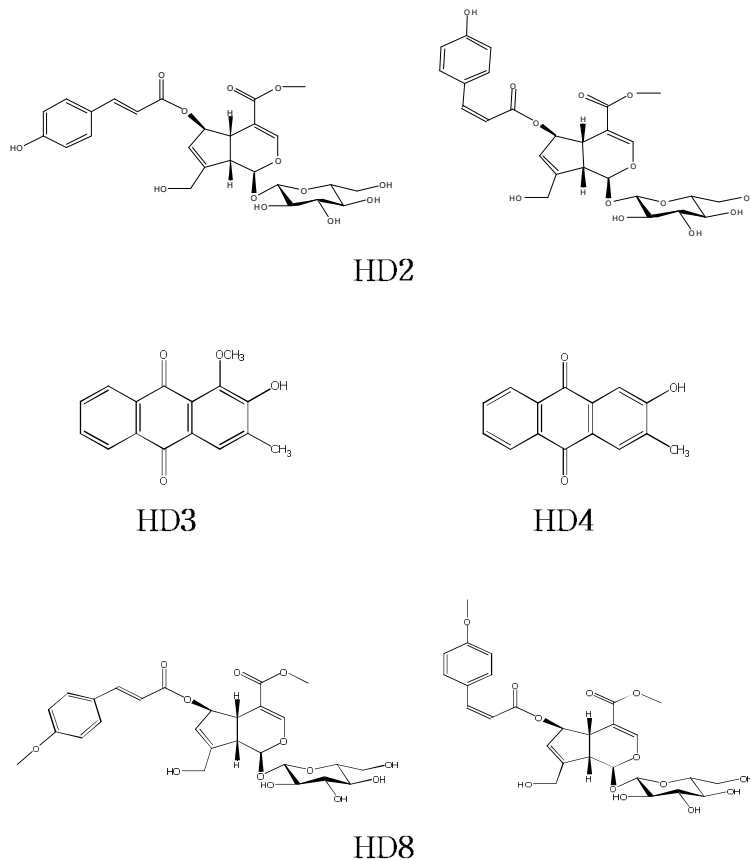


그림 44. 백운풀 추출물의 4가지 지표성분.

(2) 지표성분의 최적분석 조건 확립

: 설정된 4종의 지표성분을 대상으로 HPLC 최적분석 조건을 확인하였다. HPLC 조건은 표 3과 같다. 이러한 분석조건을 통하여 20분 이내에 모든 지표성분을 분석할 수 있었으며, 이는 기존에 알려진 방법¹⁰⁾에 비하여 분석 소요시간이 20분 이상 단축되어 경제적인 효율성을 보인다고 할 수 있다 (그림 45).

표 3. 지표성분의 최적분석 조건 확립을 위한 HPLC 조건.

HPLC system	Waters		
Column	Merck Chromolith RP-18e (100×4.6 mm)		
Flow rate	2.0 mL/min		
Detection	UV 280 nm		
Injection volume	10 µL		
Sample conc.	10,000 ppm		
	Time (min)	Solvent A (%) H ₂ O+0.5% HOAc	Solvent B (%) MeOH+0.5% HOAc
Mobile phase	0	80	20
	9	40	60
	18	40	60
	20	80	20

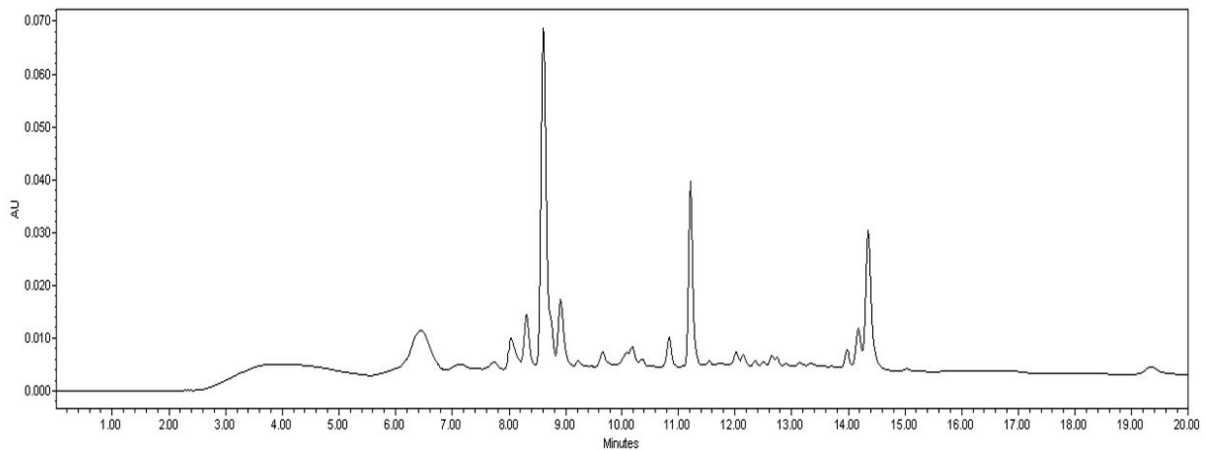


그림 45. HPLC 최적 분석조건에 의한 4가지 지표성분의 크로마토그램.

다. 비만생쥐 모델에서 백운풀 추출물의 체지방 감소효과 검증

(1) 추출물의 몸무게 및 체지방 감소효과 검증

(가) 검증방법

: 비만생쥐 모델을 유도하기 위해 고지방 사료 (High Fat Diet, HFD)를 4주 동안 먹였다. 비만을 유도한 후 고지방식과 함께 백운풀 추출물을 4주 동안 150 mg, 300 mg을 경구투여하여 몸무게의 변화를 확인하였다. 그리고 백운풀 추출물에 따른 먹이 섭취량을 확인하기 위해 먹이 전체 섭취량을 생쥐 몸무게 10 g당으로 환산하여 먹이 섭취량을 측정하였다. 그리고 마지막으로 8주 후 희생한 후 복부 비만 정도를 확인하였으며, 간 무게를 측정하였다.

(나) 검증결과

- ① 희생하기 전 몸무게를 측정한 결과 대조군에 비해 비만생쥐 모델에서 몸무게가 10 g 정도 증가하였으므로 고지방식으로 유도한 비만생쥐 모델은 백운풀 추출물의 몸무게 감소효과를 검증하기 위한 모델로 적합한 것으로 판단되었다. 백운풀 추출물의 몸무게 감소효과를 검증하기 위해 비만생쥐 모델에 150 mg 과 300 mg의 백운풀 추출물을 경구투여 하였다. 그 결과 대조군에 비해 몸무게가 증가하였지만 고지방식 생쥐에 비해 약 5 g의 몸무게가 감소함이 확인되었다. 이는 곧 백운풀 추출물에 의해 체중 감소 효과가 있는 것으로 판단되었다 (그림 46A).
- ② 그리고 적출한 간 조직 무게와 몸무게 비율을 비교해 본 결과 대조군에 비해 비만생쥐에서 20% 이상 유의성 있게 감소함을 확인하였다. 그리고 백운풀 추출물을 투여한 개체들에서는 대조군에 비해 30%이상 유의성 있게 감소함을 확인하였다. 이것은 첫째, 대조군에 비해 상대적으로 고지방식으로 유도한 비만생쥐 모델의 몸무게 증가 폭이 커서 비율이 감소한 것으로 판단되었다. 둘째, 비만생쥐 모델의 간 조직에 지방의 축적이 더 많아서 부피는 커졌지만 상대적으로 무게는 적게 나와 간 조직 무게와 몸무게 비율이 감소한 것으로 판단되었다 (그림 23B, *** $P > 0.001$; ** $P > 0.01$; * $P > 0.05$).

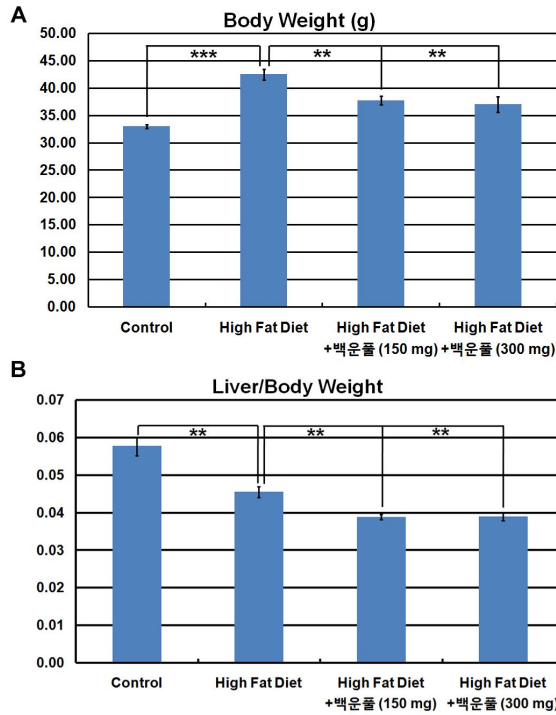


그림 46. 비만생쥐 모델에서 백운풀 추출물의 몸무게 감소에 미치는 영향.

③ 다음으로는 백운풀 추출물이 먹이 섭취량에도 영향이 있는지 확인하기 위해 일주일씩 먹이 섭취량을 조사하였다. 그 결과 전체적으로 고지방식의 경우 실험이 진행될수록 먹이섭취량이 감소하는 추세를 보였다. 그러나 백운풀 추출물을 투여하기 시작한 5주째부터 고지방식을 먹인 개체들보다 백운풀 추출물, 특히 고농도로 투여한 개체들에서 먹이 섭취량이 증가함을 확인하였다. 먹이 섭취량이 증가할수록 몸무게 또한 증가하는 것이 일반적이지만 백운풀 추출물을 투여한 개체들에서는 몸무게가 감소한 것으로 확인되었다. 이 결과는 백운풀 추출물이 먹이 섭취량에 영향을 준 것보다는 백운풀 추출물의 생체내의 항비만과 관련된 단백질들의 활성화에 의한 것이라고 판단되었다 (그림 47).

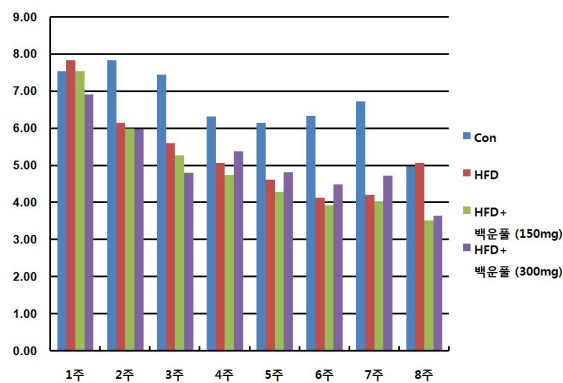


그림 47. 백운풀 추출물의 투여에 의한 먹이 섭취량 변화.

④ 백운풀 추출물이 복부 지방의 감소에 효과가 있는지 확인하기 위해 간 조직 분리 전에 복부 지방을 관찰하였다. 그 결과 대조군에 비해 비만생쥐 모델에서 복부 지방이 현격하게 증가하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 백운풀 추출물의 경우 고농도로 투여한 생쥐에서 비만생쥐 모델에 비해 현저히 감소하였을 뿐만 아니라 저농도로 투여한 생쥐에 비해서도 축적된 지방의 양이 감소하고 있음을 확인하였다. 이것으로 보아 백운풀 추출물은 몸무게 감소뿐만 아니라 체지방의 감소에도 효과가 있음을 확인하였다 (그림 48).

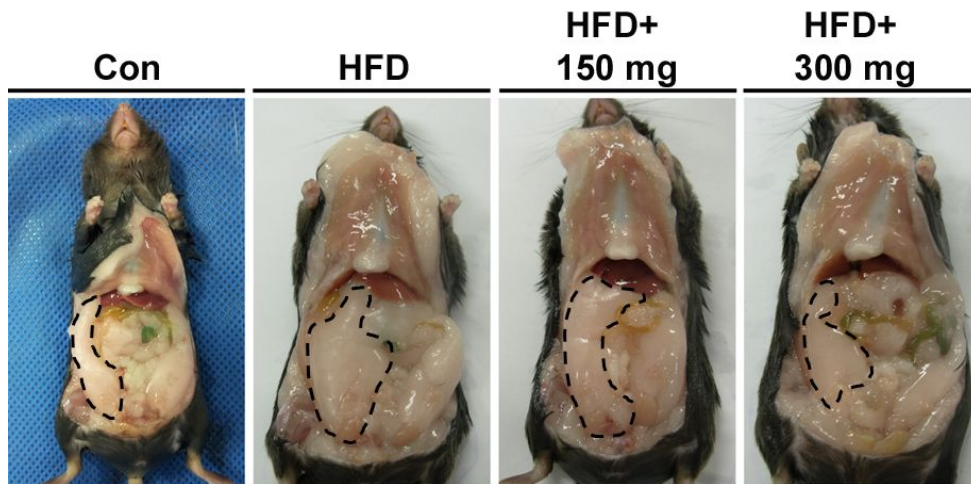


그림 48. 희생 후 복부의 체지방 감소효과 검증.

라. 비만생쥐 모델에서 각종 혈액 생화학적 검사 및 간 조직 분석

(1) 백운풀 추출물 투여에 따른 혈액 생화학적 수치 변화 검증

(가) 검증방법

: 희생하기 전 생쥐에서 혈액을 100-150 μ l 추출하였다. 그리고 혈액에서 혈장만을 분리하기 위해 항응고제로 헤파린을 첨가한 후 2500 g에서 10분간 원심분리하여 혈장만을 분리하였다. 분리한 혈장을 급속냉동냉장고에 보관 후 총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤을 진단시약을 이용하여 측정하였다.

(나) 검증결과

: 혈액의 생화학적 검사를 위해 우선 총콜레스테롤 수치의 경우 대조군에 비해 비만생쥐 모델에서 크게 증가한 것을 확인하였다. 그러나 백운풀 추출물을 투여한 개체, 특히 고농도로 측정된 개체들에서는 대조군에 비해서는 증가하고 있지만, 비만생쥐 모델에 비해 5% 이상 감소한 것을 확인하였다. 그러나 중성지방의 경우에는 대조군에 비해 비만생쥐 모델, 백운풀 추출물을 투여한 개체들에서 감소한 것을 확인하였다. 그리고 HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤의 경우에는 대조군, 고지방식 그리고 백운풀 추출물을 투여한 개체들에서 모두 큰 차이가 없는 것을 확인하였다 (그림 49).

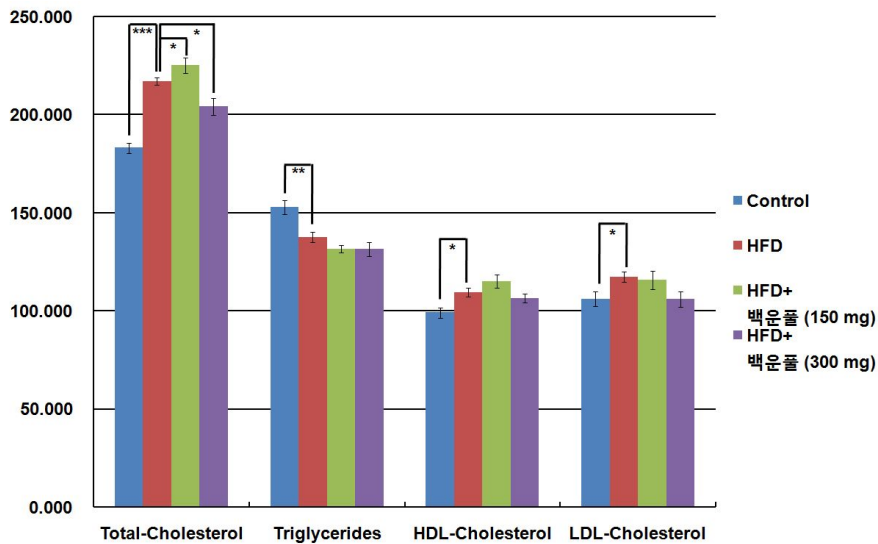


그림 49. 백운풀 추출물 투여에 따른 혈액 생화학적 수치 검증.

(2) 백운풀 추출물 투여에 따른 간 조직에서의 지방량의 변화 검증

(가) 검증방법

: 간 조직을 분리한 후 4% paraformaldehyde에 고정시킨 후 24시간 동안 냉장고에 보관하였다. Cryosection을 위해 4% paraformaldehyde 제거 후 10% saccharose로 용액을 제거한 후 3시간 동안 냉장고에 보관 후 30% saccharose 용액으로 조직을 24시간 동안 embedding시켰다. 그리고 간 조직을 OCT (Optimal Cutting Temperature) 용액으로 embedding시킨 후 드라이 아이스를 이용하여 cryo mold를 완성하였다. Cryotome을 이용하여 7-10 μ M 두께로 section하여 -70°C 에서 보관 후 지방을 관찰하기 위해 oil red O 염색을 수행하였다.

(나) 검증결과

: Oil red O 염색을 수행한 결과, 비만생쥐 모델에서 대조군에 비해 염색된 부분이 현저히 증가하고 있는 것으로 보아 고지방식에 의해 간 조직에서 지방이 증가하고 있음을 확인하였다. 그리고 이렇게 증가된 지방의 경우 백운풀 추출물을 투여한 개체의 조직에서 감소함을 확인하였으며, 고농도의 백운풀 추출물 투여 개체에서 더 크게 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 백운풀 추출물이 간 조직에서 지방을 감소시키는 것으로 판단되었다 (그림 50).

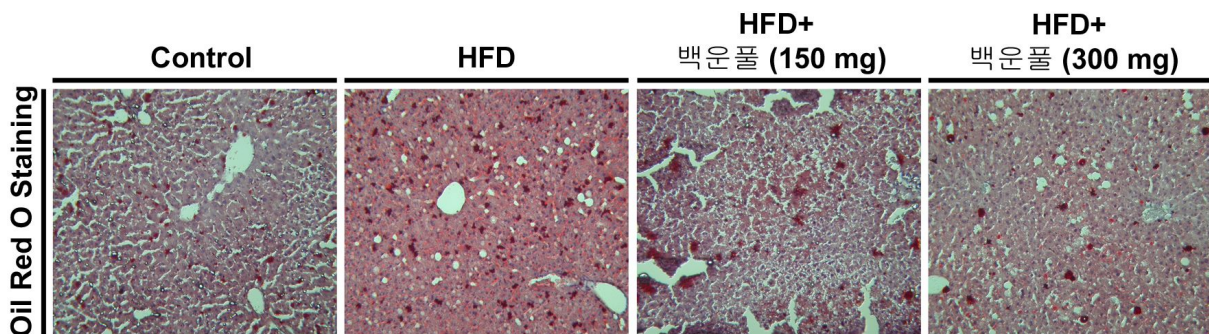


그림 50. Oil red O 염색을 통한 간 조직에서의 지방량 분석.

마. HeLa 세포에서 HD1 (ursolic acid) 처리에 의한 AMPK 활성화

(1) 검증방법

: Ursolic acid가 CaMKK의 활성의 증가를 일으켜 AMPK의 인산화를 증가시키는지 확인하였다. 이를 위해 2 종류의 AMPK upstream kinase 들 중 LKB1이 결여된 세포인 HeLa cell에 ursolic acid를 처리하여 AMPK의 활성화 증가가 일어나는지 확인하였다.

(2) 검증결과

: 1차년도 연구에서는 ursolic acid가 LKB1에 더 의존하는 것으로 생각되었으나 추후 실험을 수행한 결과, LKB1이 결여된 HeLa cell에서 ursolic acid에 의한 AMPK의 인산화가 농도별로 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 1차년도 연구에서는 HeLa 세포에서 ursolic acid가 효과를 나타내지 못하는 것으로 보였는데 이는 화합물의 안정성의 문제였던 것으로 생각된다. Ursolic acid로 새롭게 실험 한 결과, HeLa 세포에서 농도 의존적으로 AMPK가 증가하는 것을 알 수 있었고 이는 상위 효소인 CaMKK에 더 의존함을 알 수 있었다 (그림 51).

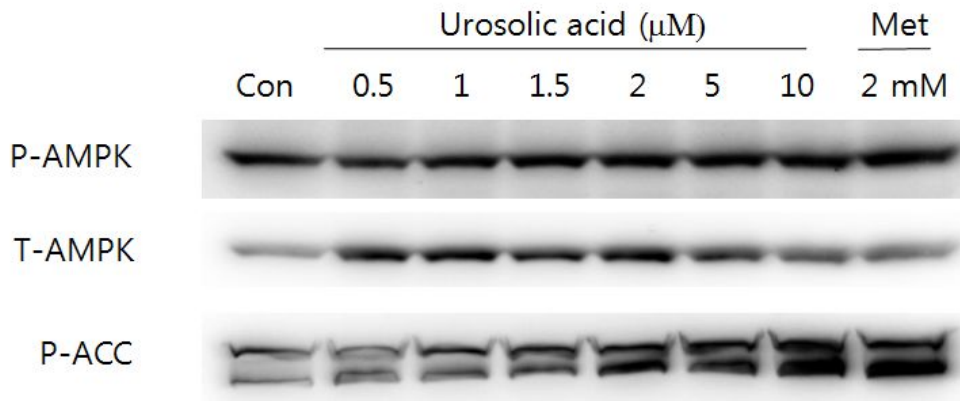


그림 51. HeLa 세포에서 ursolic acid의 농도에 따른 AMPK와 ACC의 활성화 확인.

바. HD1 (ursolic acid) 처리에 의한 calcium 유입 증가

(1) 검증방법

: HT22 hippocampal neuronal cell을 24 well plate에 1.25×10^5 개 seeding 후 37°C , 5% CO_2 조건으로 24시간 배양했다. 그 다음 starvation을 유도하기 위하여 FBS를 포함하지 않은 DMEM 배지를 4시간 처리해 주었다. Oregon green 488 BAPTA-1 AM $5 \mu\text{M}$ 을 40분간 배양하고 external solution (in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 11mM glucose, pH7.4)로 2번 세척 후 ursolic acid를 1분간 처리 후 LSM 5 PASCAL confocal microscopy로 관찰하였다.

(2) 검증결과

: Ursolic acid가 AMPK를 활성화 시키는 상위 효소 중 LKB1보다 Calcium/Calmodulin protein kinase kinase (CaMKK)에 의존한다는 것을 확인한 후, ursolic acid가 직접적으로 calcium influx에도 관여하는지 알아보기 위해 $10 \mu\text{M}$ 및 $40 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리한 결과 양성대조군인 $5 \mu\text{M}$ Ionomycin을 처리한 것과 같은 양의 calcium influx가 관찰되었다. 이는 ursolic acid가 세포 내 calcium의 증가를 통해 CaMKK를 활성화시키고, 그로인해 AMPK가 활성화 된다는 것을 확인할 수 있었다 (그림 52).

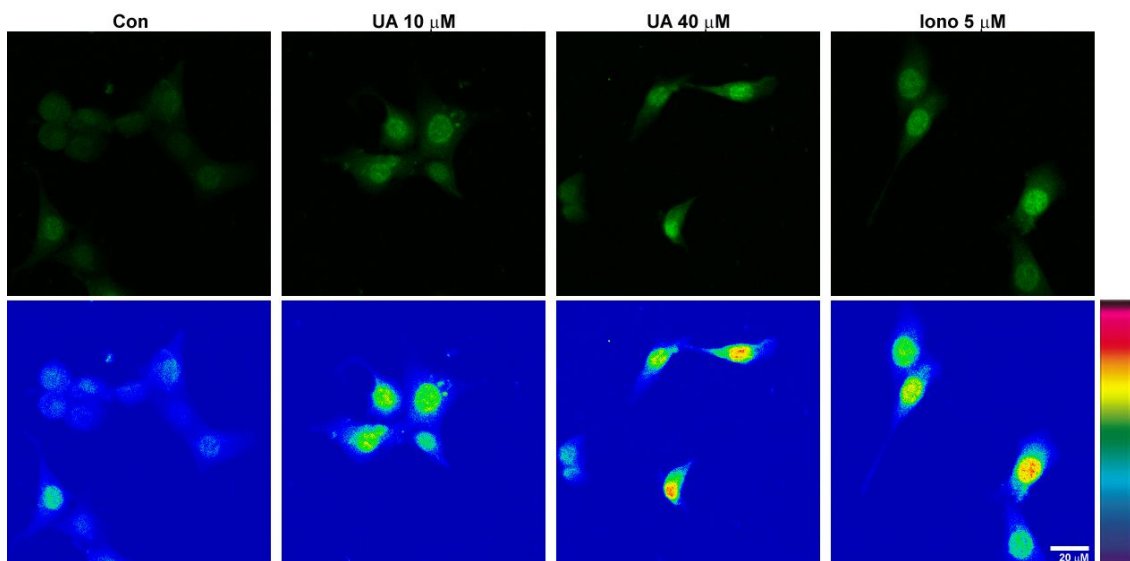


그림 52. HT22 세포에서 calcium 유입 측정.

사. HD3 (digitolutein)의 농도 의존적 AMPK 활성화

(1) 검증방법

: L6 myotube cell을 AMPK 및 ACC 활성화검증에 이용하기 위하여 추출물 처리 10일 전에 세포를 분화시켰다. L6 myotube cell을 10% FBS α -MEM의 배지 상에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 12시간 이상 배양한 후, 세포가 petri dish에 정착된 것이 확인되면 2% FBS α -MEM으로 배지를 교체하여 배양하였다. 48시간 마다 배지를 교환해 주면서 세포를 10일 동안 배양한 뒤에 starvation을 유도하기 위하여 FBS를 포함하지 않은 α -MEM 배지를 처리해 주었다. 4시간 후, digitolutein을 농도별로 2시간 동안 처리하고 Western blotting을 위해 cell lysis buffer로 단백질을 추출을 실시하였다. Western blotting은 p-AMPK와 p-ACC의 특이적 항체를 통해 진행되었으며, 양성대조군으로 2 mM metformin을 처리하였다.

(2) 검증결과

: 근육세포인 L6 cell에서 digitolutein의 농도 의존적 AMPK의 활성화가 나타났다. 즉 L6 근육세포에 digitolutein을 1, 10, 20, 40, 60, 80 μ M의 농도로 2 시간 처리하였을 때, AMPK α subunit의 인산화 정도는 10 μ M부터 증가 하였으나 AMPK의 하위 signal인 ACC의 인산화 형태는 변하지 않았다. ACC의 인산화 정도가 변하지 않은 것은 ACC를 인산화 시키기 위해서는 AMPK를 인산화 시키는 농도보다 더 높은 농도가 필요할 것이라 판단된다 (그림 53).

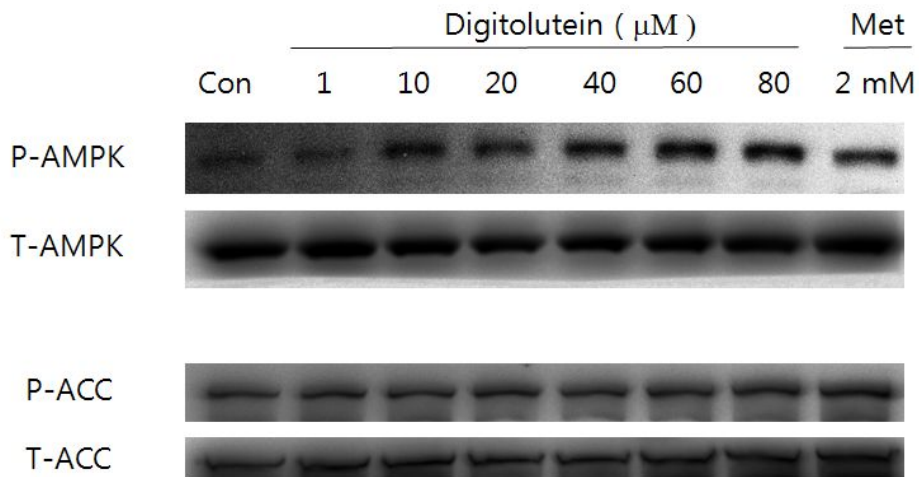


그림 53. L6 세포에서 digitolutein의 농도에 따른 AMPK와 ACC의 활성화 확인.

아. HD2의 농도 의존적 AMPK 활성화

(1) 검증결과

: 근육세포인 L6 cell에서 HD2의 농도 의존적 AMPK의 활성화가 나타났다. 즉 L6 근육세포에 HD2를 1, 10, 20, 40, 60, 80 μM 의 농도로 2 시간 처리하였을 때, AMPK α subunit의 인산화 정도는 40 μM 부터 증가 하였으나 AMPK의 하위 signal인 ACC의 인산화 형태는 변하지 않았다. 따라서 1년차 연구결과 및 digitolutein의 결과를 바탕으로 생각해 볼 때, 화합물의 농도를 더 높여 실험을 재수행하면 ACC의 인산화가 유도될 것으로 예상된다 (그림 54).

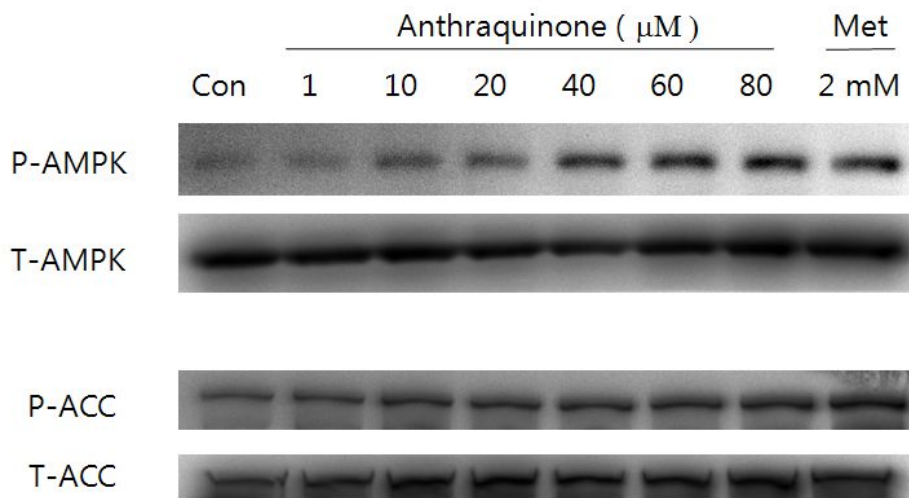


그림 54. L6 세포에서 HD2 농도에 따른 AMPK와 ACC의 활성화 확인.

3. 3차년도 (2012. 07. 01 - 2013. 06. 30)

가. 백운풀 지표성분의 validation

(1) 분석방법

- (가) Validation은 식약청에서 고시된 ‘의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인 적용을 위한 해설서 (2008)’를 바탕으로 실시하였다. 백운풀의 지표성분으로 선정된 4종의 화합물 (digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester)을 MeOH에 1 mg/mL의 농도로 용해시키고, 이를 stock solution으로 사용하였다. 이 용액을 단계적으로 희석하여 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00 $\mu\text{g/mL}$ 로 총 6개의 농도구간을 설정하였으며, 0.45 μm membrane filter 로 여과한 후 HPLC 분석을 실시하였다. 분석을 통해 얻어진 peak area 값을 이용하여 calibration curve를 작성하였다.
- (나) 분석기기의 limit of detection (LOD; 검출한계)는 signal 대 noise의 비가 3일 때, limit of quantification (LOQ; 정량한계)는 LOD \times 3.3 일 때의 시료농도로 나타내었다. 또한 일내 정밀성과 반복성을 측정하기 위하여 하루에 3회 반복 HPLC 분석을 실시하였으며, 일간 정밀성과 반복성을 측정하기 위하여 3일 동안 반복 분석하여 그 값을 도출하였다.

(2) 분석결과

(가) 지표성분의 검량선 (calibration curve) 작성

: (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester의 검량선의 상관계수 (R^2)는 각각 0.9993, 0.9991, 0.9999, 0.9998로 높은 직선성을 나타내었다 (그림 55).

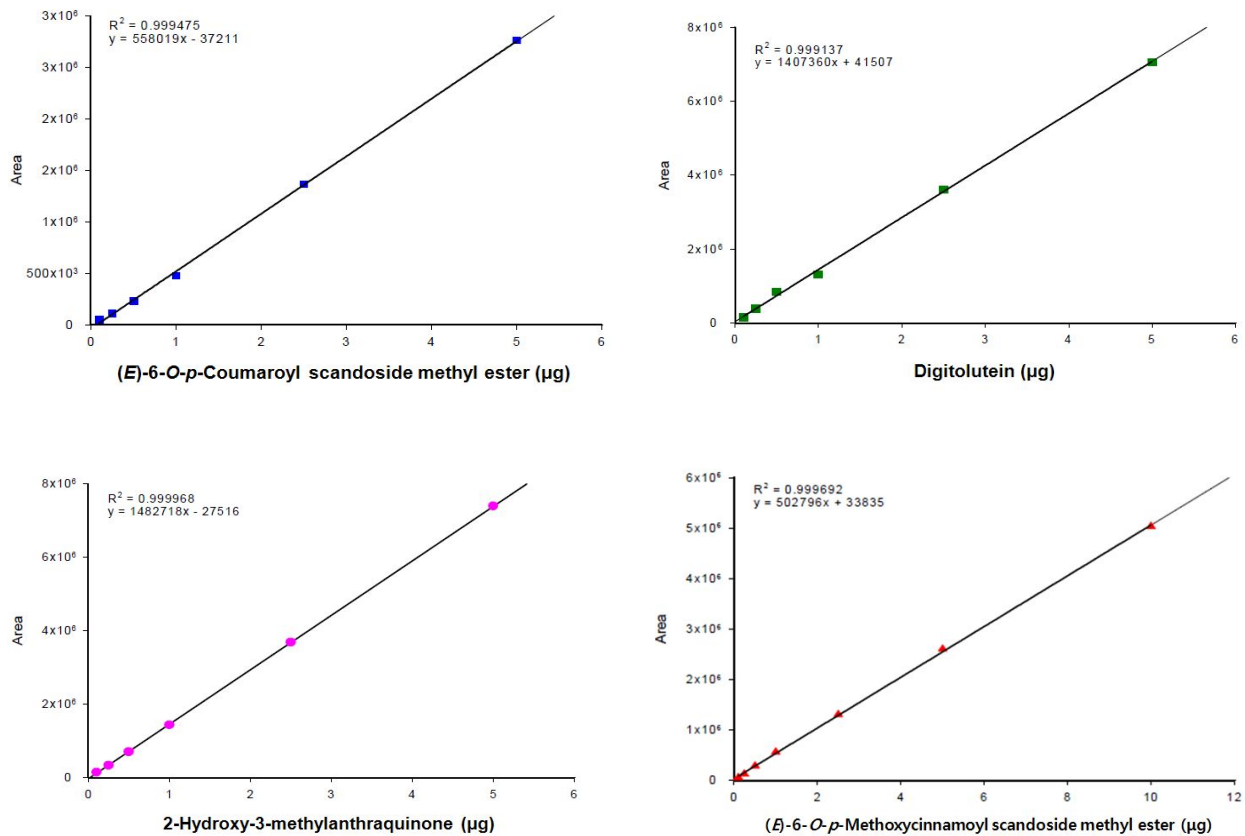


그림 55. 백운풀 지표성분의 검량선.

(나) 지표성분의 검출한계 (LOD) 및 정량한계 (LOQ)

: 4 종의 지표성분에 대한 검출한계를 조사한 결과, (E)-6-O-p-coumaroyl scandoside methyl ester, digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, (E)-6-O-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester 각각 0.03, 0.05, 0.06, 0.07 µg/mL로 나타났으며, 정량한계는 각각 0.990, 0.165, 0.198, 0.231 µg/mL인 것으로 확인되었다 (Table 4).

Table 4. 백운풀 지표성분의 검출한계 (LOD) 및 정량한계 (LOQ).

Compound	Linear range (µg)	Slope	Intercept	Correlation coefficient	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
HD2	0.1 - 5.0	559421	-43370	0.9993	0.03	0.099
HD3	0.1 - 5.0	1407361	41508	0.9991	0.05	0.165
HD4	0.1 - 5.0	1482718	-27516	0.9999	0.06	0.198
HD8	0.1 - 5.0	516425	19517	0.9998	0.07	0.231

HD2: (E)-6-O-p-coumaroyl scandoside methyl ester.

HD3: digitolutein.

HD4: 2-hydroxy-3-methylanthraquinone.

HD8: (E)-6-O-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester.

(다) 지표성분의 면적 비에 대한 재현성 (RSD)

: 지표성분의 면적 비에 대한 재현성을 분석한 결과, (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester 각각 1.18, 0.16, 0.90, 0.58%인 것으로 나타났다 (Table 5).

Table 5. 백운풀 지표성분의 면적 비에 대한 재현성 (RSD).

Compound	Spiked concentration (μg)	Peak area		
		Average	SD	RSD (%)
HD2	0.25	0.2711	0.0032	1.18
HD3	0.25	0.2597	0.0004	0.16
HD4	0.25	0.2506	0.0002	0.90
HD8	0.25	0.2378	0.0014	0.58

HD2: (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester.

HD3: digitolutein.

HD4: 2-hydroxy-3-methylanthraquinone.

HD8: (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester.

(라) 지표성분의 일내 정밀성 (CV) 및 정확성 (accuracy)

: (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester의 일내 정밀성은 1.18, 0.23, 2.00, 0.26%으로 조사되었으며, 일내 정확성은 각각 108.44, 102.80, 96.08, 94.60%로 나타났다 (Table 6).

Table 6. 백운풀 지표성분의 일내 정밀성 (CV) 및 정확성 (accuracy).

Compound	Spiked concentration (μg)	Observed concentration (μg)	Intra-day ($n=3$)			
			SD	Bias	CV (%)	Accuracy (%)
HD2	0.25	0.2711	0.0032	-0.0211	1.18	108.44
HD3	0.25	0.2570	0.0006	-0.0070	0.23	102.80
HD4	0.25	0.2402	0.0048	0.0098	2.00	96.08
HD8	0.25	0.2365	0.0006	0.0135	0.26	94.60

HD2: (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester.

HD3: digitolutein.

HD4: 2-hydroxy-3-methylanthraquinone.

HD8: (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester.

(마) 지표성분의 일간 정밀성 (CV) 및 정확성 (accuracy)

: (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester, digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester의 일간 정밀성은 0.98, 0.25, 1.16, 0.30%으로 조사되었으며, 일간 정확성은 각각 110.23, 102.82, 98.58, 94.73%로 나타났다 (Table 7).

Table 7. 백운풀 지표성분의 일간 정밀성 (CV) 및 정확성 (accuracy).

Compound	Spiked concentration (μg)	Inter-day ($n=3$)				
		Observed concentration (μg)	SD	Bias	CV (%)	Accuracy (%)
HD2	0.25	0.2756	0.0027	-0.0256	0.98	110.23
HD3	0.25	0.2571	0.0007	-0.0071	0.25	102.82
HD4	0.25	0.2464	0.0029	0.0036	1.16	98.58
HD8	0.25	0.2368	0.0007	0.0132	0.30	94.73

HD2: (*E*)-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester.

HD3: digitolutein.

HD4: 2-hydroxy-3-methylanthraquinone.

HD8: (*E*)-6-*O*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester.

나. AMPK 활성화와 관련된 anthraquinone 류의 구조-활성 상관관계

(1) Anthraquinone 류 화합물의 수집

: 30 및 60 $\mu\text{g/mL}$ 의 수준에서 AMPK 활성이 나타난 anthraquinone계 화합물인 digitolutein (HD3) 및 2-hydroxy-3-methylanthraquinone (HD4)의 구조적인 연관성을 파악하고자 구조 및 활성 상관관계를 파악하고자 하였다. 분리량이 적은 digitolutein 및 2-hydroxy-3-methylanthraquinone에 대해서는 경북대학교 약학대학 이태호 교수님의 도움을 얻어 유기합성 하였고, 추가적인 화합물은 특급시약을 구입하여 총 15 종의 화합물을 수집하여 실험에 사용하였다 (Table 8).

Table 8. AMPK 활성화에 대한 구조-활성 상관관계 탐색에 사용된 화합물 목록.

No.	Sample name
1	2-hydroxy-1-methoxy-3-methylanthraquinone
2	2-hydroxy-3-methylanthraquinone
3	1,2-dihydroxy-3-methylanthraquinone
4	1-hydroxy-2-methoxymethoxy-3-methylanthraquinone
5	1,2-dimethylanthraquinone
6	1-hydroxy-2,3-dimethylanthraquinone
7	1-hydroxy-3-methylanthraquinone
8	1-methoxy-2-methylanthraquinone
9	2,3-dimethylanthraquinone
10	1,2,4-trihydroxyanthraquinone
11	1,4-dihydroxyanthraquinone
12	1-hydroxyanthraquinone
13	2-hydroxyanthraquinone
14	2-methylanthraquinone
15	anthraquinone

(2) 실험결과

(가) 총 15종의 anthraquinone 계통 화합물에 대해 10 μM 수준에서 AMPK 및 ACC의 인산화 정도를 확인하였다. 그 결과, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone (HD4)는 10 μM 수준에서도 AMPK 인산화를 촉진하였으나, 반면 digitolutein은 효과가 없음을 알 수 있었다. Digitolutein의 경우, 10 μM 의 낮은 농도에서는 AMPK 인산화를 증가시킬 수 없으나, 30 및 60 $\mu\text{g/mL}$ 과 같이 고농도로 세포에 처리되어야 활성을 보이는 것으로 판단되었다.

- (나) 또한 흥미로운 결과로 1-hydroxyanthraquinone (sample 12)과 anthraquinone (sample 15)에서 강력한 AMPK 및 ACC 인산화가 증가된 것을 관찰할 수 있었다.
- (다) 이러한 결과만을 통해서 anthraquinone 류의 AMPK 및 ACC 인산화에 대한 구조적인 상관관계를 정확하게 판단하기는 어려우나, 대체적으로 anthraquinone이 AMPK 인산화를 가장 촉진시키는 것으로 나타났으며 anthraquinone 기본골격에 추가적인 functional group이 적게 포함되어 있을수록 오히려 AMPK 인산화를 증가시킬 수 있는 것으로 확인되었다 (그림 56).
- (라) 앞으로 구조-활성 상관관계에 대해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 보이며, 일부 anthraquinone 계통 화합물에서 AMPK 활성이 나타남을 확인한 것은 본 연구를 통해 처음으로 확인한 결과이므로 매우 가치 있다고 판단된다.

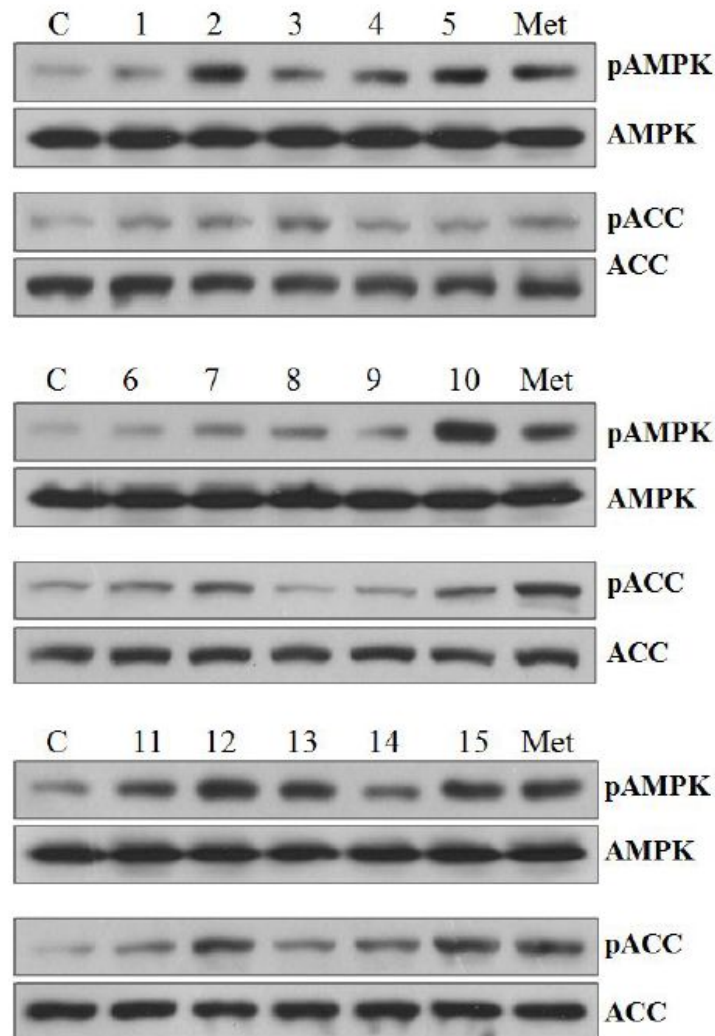


그림 56. 다양한 anthraquinone 계통 화합물에 의한 pAMPK 및 pACC level의 변화.

※ 실험에 사용된 모든 화합물은 10 μ M 농도로 처리되었으며, 2 mM metformin은 양성대조군으로 사용되었다.

다. 유전적 비만생쥐 모델에서 체지방 증가억제에 대한 백운풀 추출물 효과 조사

(1) 검증방법

: 추출물의 몸무게 및 체지방 증가억제 효과를 검증하기 위해 유전적 비만 생쥐모델인 ob/ob mouse를 이용해 실험을 수행했다. 유전적 비만 생쥐 모델을 이용하여 8주간 사료를 먹임과 동시에 백운풀 추출물 300 mg, 500 mg을 8주 동안 경구투여 하여 몸무게의 변화를 확인하였다. 그리고 백운풀 추출물에 따른 먹이 섭취량을 확인하기 위해 먹이 전체 섭취량을 생쥐 몸무게 10g당으로 환산하여 먹이 섭취량을 측정하였다. 8주 간의 실험이 종료된 후 생쥐를 희생하여 복부 비만 정도를 확인하였으며, 간 무게/전체 무게의 비율을 측정하였다.

(2) 검증결과

(가) 백운풀 추출물의 체지방증가 억제 효과를 검증하기 위해 유전적 비만생쥐 모델 (ob/ob mouse)에 300 mg과 500 mg의 백운풀 추출물을 8주간 투여 하며 매주 몸무게의 변화를 확인하였다. 몸무게의 변화를 분석한 결과 백운풀 추출물 500 mg 씩을 투여한 실험군에서 대조군에 비해 몸무게 증가효과가 억제되는 것을 확인하였으며(그림 57A), 8주간 백운풀 추출물을 500 mg 추출한 실험군에서 대조군에 비해 약 7.5 g의 몸무게가 감소함이 확인되었다 (그림 57B, *** $p > 0.001$; ** $p > 0.01$; * $p > 0.05$).

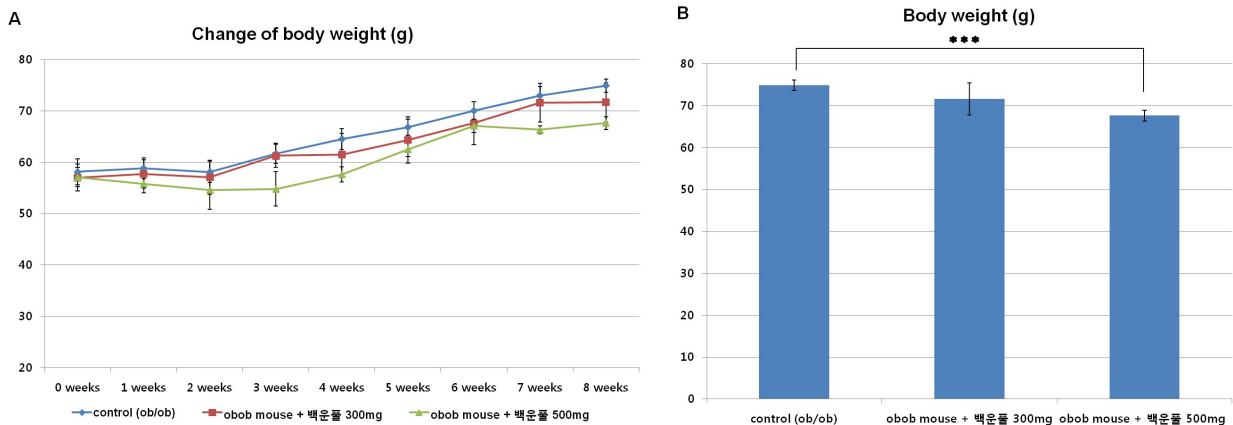


그림 57. 유전적 비만생쥐 모델에서 백운풀 추출물의 몸무게 감소에 미치는 영향.

(나) 백운풀 추출물의 간 조직에 대한 영향을 확인 하고자 적출한 간 조직과 전체 무게의 비율을 비교하였다. 그 결과 백운풀 추출물 500 mg을 투여한 실험군에서 대조군에 비해 간중량/체중의 비가 20% 이상 유의성 있게 감소함을 확인 하였다 (그림 58).

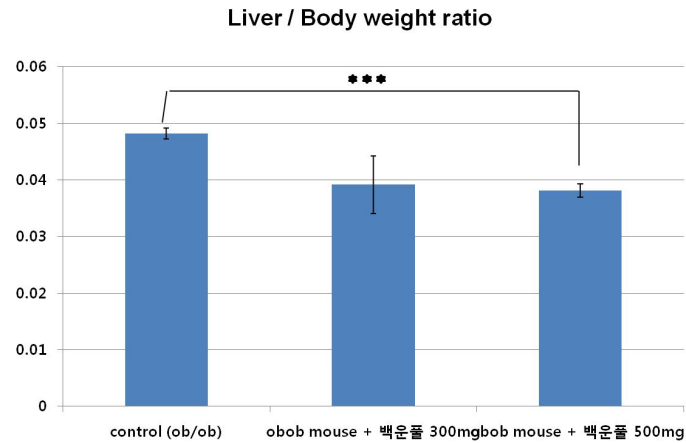


그림 58. 유전적 비만생쥐 모델에서 백운풀 추출물의 간조직에 미치는 영향.

(다) 다음으로 백운풀 추출물이 유전적 비만 생쥐 모델의 먹이 섭취량에도 영향을 주는 지 확인 하고자 일주일 단위로 먹이 섭취량을 확인하였다. 그 결과 대조군에 비해 백운풀 추출물을 투여한 실험군에서 먹이 섭취량이 감소됨을 확인 하였다(그림 59).

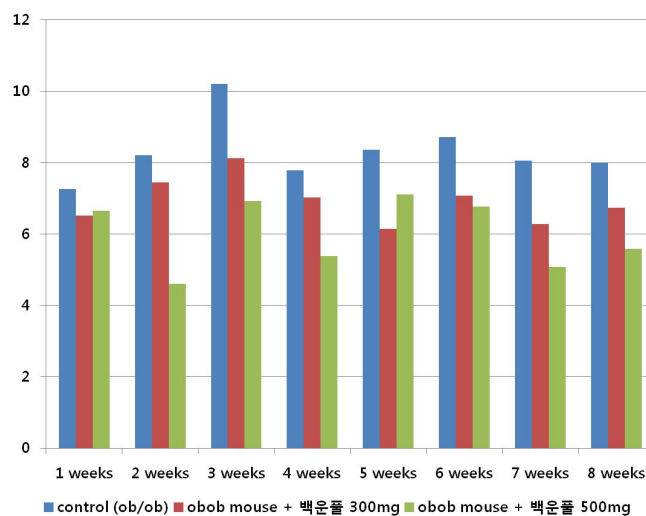


그림 59. 백운풀 추출물 (300 mg, 500 mg) 투여에 의한 먹이 섭취량 변화.

(라) 백운풀 추출물이 복부 지방의 감소에 효과가 있는지 확인하고자 생쥐의 장기를 적출 하기전 복부 지방을 관찰하였다. 대조군에서는 내장 주위로 복부지방이 다량 형성됨을 확인 하였다. 백운풀 추출물 300 mg 투여군의 경우 대조군에 비해 복부 지방이 감소함을 확인 하였으며 500 mg 투여군에서는 복부지방의 감소가 더욱 증가됨을 확인 하였다. (그림 60).

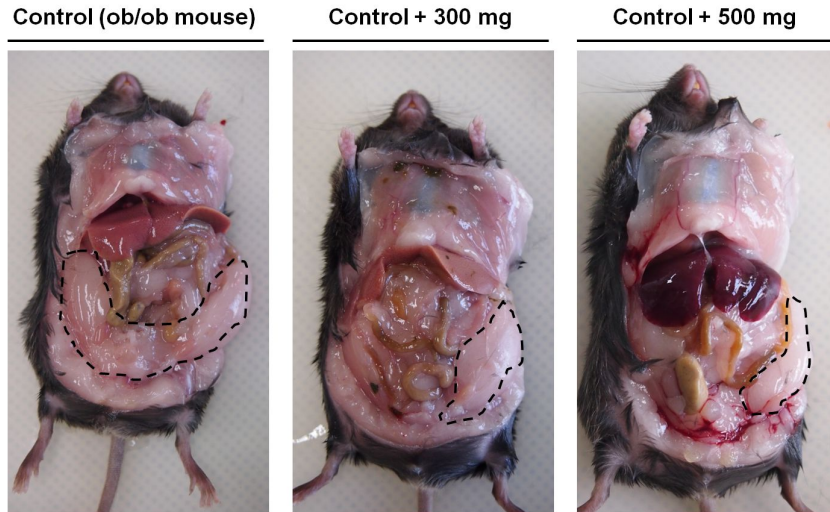


그림 60. 희생 후 복부 체지방 감소효과 검증.

(마) 백운풀 추출물 투여군에서 체중 감소 및 간 무게 / 전체 무게 비의 감소, 체지방 감소 등 실험 결과를 통해 백운풀 추출물이 체지방 증가 억제 및 몸무게 감소에 효과가 있음을 확인하였다.

라. 유전적 비만생쥐 모델에서 백운풀 추출물 투여에 따른 혈액 생화학적 검사 및 조직검사

(1) 혈액 생화학적 검사

(가) 검증방법

: 백운풀 추출물 투여에 따른 혈액 내 생화학적 수치 변화를 검증하고자 먼저 혈당량을 확인하였다. 혈당량 검증은 매주 1회 4시간의 단식 후 생쥐의 꼬리에서 혈액을 채취해 측정하였다. 다음으로 혈액 내 콜레스테롤을 분석하고자 실험에 사용된 생쥐를 희생하기 전 혈액을 100-150 μ l 추출하였다. 그리고 항응고제로 헤파린을 첨가한 후 2500 g에서 10분간 원심분리하여 혈장만을 분리하였다. 분리한 혈장을 급속냉동냉장고에 보관 후 총 콜레스테롤, 중성지방을 진단시약을 이용해 측정하였다.

(나) 검증결과

① 실험을 시작 전 유전적 비만생쥐에서 혈당량을 측정한 결과 300 mg/dl 이상으로 나타났다. 백운풀 추출물의 혈당조절 효과를 검증하기 위해 백운풀 추출물 300 mg, 500 mg 투여군과 대조군의 혈당량을 주 1회 측정하였다. 측정한 결과 1주차부터 백운풀 추출물 300 mg 투여군과 500 mg 투여군 모두 대조군에 비해 혈당량이 감소한 것을 확인 할 수 있었으며 고용량 (500 mg) 투여군에서 혈당량 감소효과가 더 큰 것으로 확인 되었다. 300 mg, 500 mg 투여군 모두 혈당량 감소효과가 지속적으로 관찰 되었으며 고용량 투여군에서 혈당 감소효과가 더 확실히 검증되었다 (그림 61).

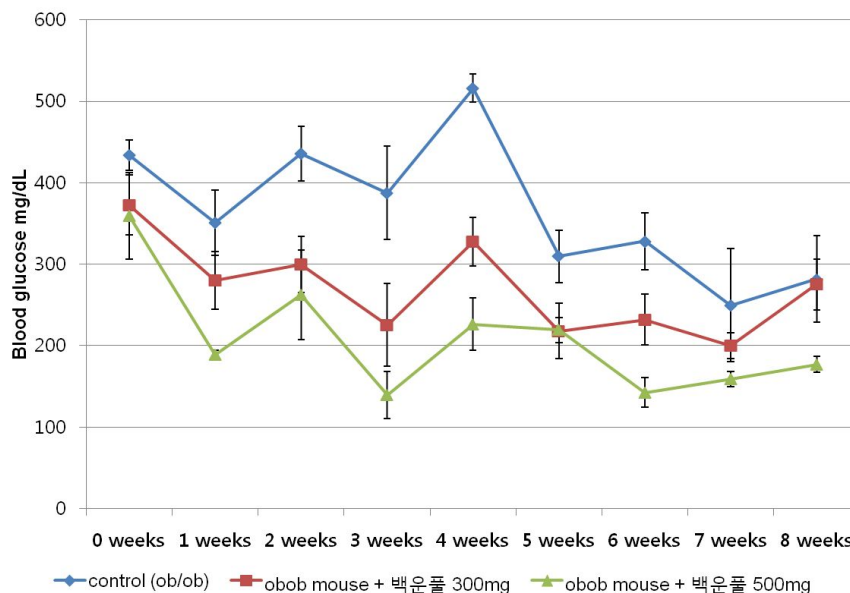


그림 61. 백운풀 추출물 투여에 따른 혈당량 변화.

② 혈액의 생화학적 검사를 위해 혈액 내 총콜레스테롤과 중성지방 수치를 확인하였다. 실험이 종료된 8주 후 대조군, 백운풀 추출물 300 mg, 500 mg 투여군에서 총콜레스테롤을 확인한 결과 대조군과 백운풀 추출물 500 mg 투여군에서 유의한 수준으로 혈액내 총콜레스테롤 수치가 감소한 것을 확인하였다(그림 62A). 다음으로 혈액 내 중성지방수치를 비교한 결과 대조군에 비해 백운풀 추출물 투여군에서 유의한 수준으로 중성지방수치가 감소한 것을 확인하였다(그림 62B).

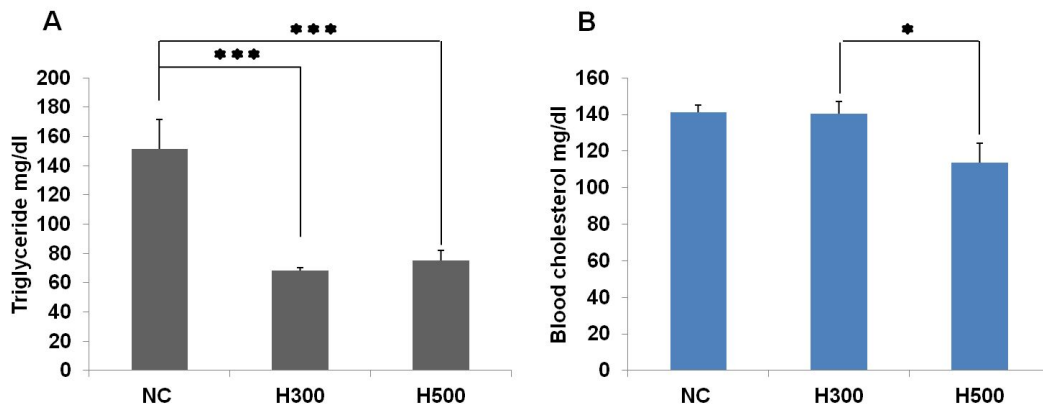


그림 62. 백운풀 추출물 투여에 따른 혈액 생화학적 수치 변화.

(2) 조직검사

(가) 검증방법

: 희생한 쥐로부터 간 조직 및 췌장조직을 분리한 후 cryosection을 위해 신선한 4% paraformaldehyde 용액에 4 ℃, 24시간 이상 고정시켰다. 4% paraformaldehyde를 제거하기 위해 PBS를 이용해 3회 세척 후 10% saccharose, 30% saccharose를 이용하여 순차적으로 dehydration 시켰다. 이후 saccharose 용액을 깨끗이 제거한 후 OCT (Optimal Cutting Temperature) 용액으로 embedding 시킨 후 액체질소를 이용하여 cryo mold를 완성하였다. cyro mold를 완성하였다. paraffin section을 위해서 4% paraformaldehyde에 고정시킨 조직을 saccharose를 이용해 순차적으로 dehydration 시킨 후 paraffin에 embedding하여 paraffin mold를 완성하였다. 완성된 mold들은 7 μm의 두께로 section하여 -70℃에 보관 후 oil red O 및 H & E 염색을 수행하였다.

(나) 검증결과

- ① 준비된 간 조직에서 H & E 염색을 수행한 결과, 대조군(ob/ob mouse)의 간 조직에서 다량의 지방이 형성됨을 확인 하였다. 백운풀 추출물 300 mg 투여군의 경우 간 조직에서 지방이 다량으로 형성되어 있으나 대조군에 비해 감소한 추세를 확인 할 수 있었다. 백운풀 추출물 500 mg 투여군은 대조군에 비해 지방이 크게 감소한 것을 확인 하였다 (그림 63).

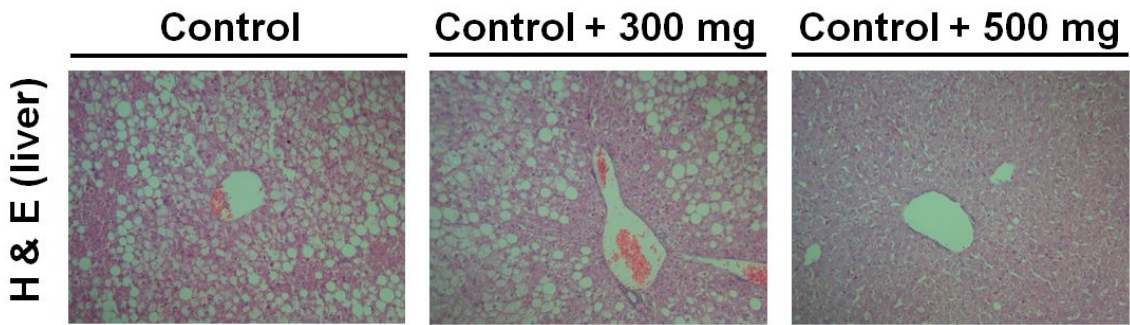


그림 63. H&E 염색을 통한 간조직 분석.

- ② 다음으로 백운풀이 간 조직 내 지방 감소 효과를 직접 확인 하고자 oil red O 염색을 수행하여 확인하였다. 대조군의 간 조직에서는 oil red O 염색에 의해 붉은 색 지방이 다량 검출되었다. 백운풀 추출물 300 mg 투여군의 간을 분석한 결과 대조군에 비해 지방 성분이 감소한 것을 확인 할 수 있었으며 500 mg 투여군에서는 대조군과 300 mg 투여군에 비해 지방 성분이 현저히 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 백운풀 추출물이 간 조직에서 지방을 감소시키는 것으로 판단되었다(그림 64).

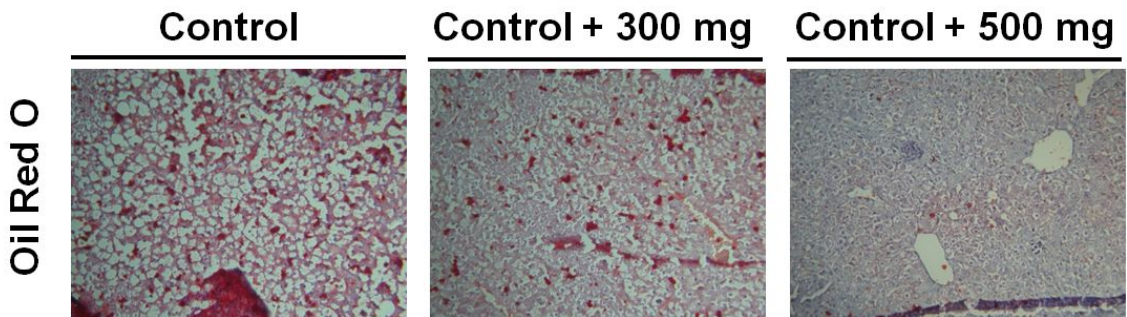


그림 64. Oil red O 염색을 통한 간조직 내 지방량 분석.

③ 췌장조직의 islet을 H & E 염색을 통해 확인한 결과, 대조군에서는 췌장조직의 islet의 세포 형태가 비정상적임을 관찰 하였다. 그러나 백운풀 추출물 300 mg 투여군의 islet은 대조군에 비해 세포형태의 이상이 감소함을 확인했으며 백운풀 추출물 500 mg 투여군은 정상적인 islet 형태를 나타내는 것으로 확인 되었다(그림 65).

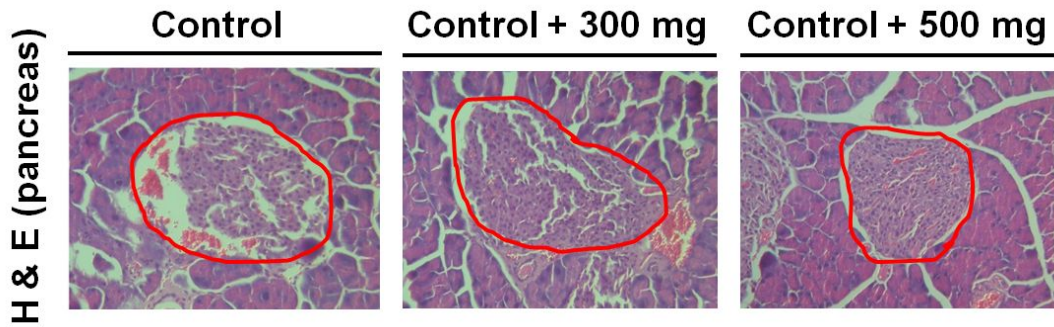


그림 65. H&E 염색을 통한 췌장 내 islet 형태 분석.

마. 유전적 비만생쥐 모델에서 백운풀 추출물 투여에 따른 독성 검사

(1) 검증방법

: 각 실험 군당 10마리의 생쥐를 대상으로 유전적 비만생쥐 대조군은 물을, 실험군은 백운풀 추출물을 8주 동안 매일 경구 투여해 생존률을 측정하였다.

(2) 검증결과

: 물만 경구투여한 대조군 10마리는 실험이 종료된 8주차 까지 총 10마리가 생존하였다. 백운풀 추출물 300 mg을 투여한 실험군의 경우 대조군과 마찬가지로 8주차 까지 총 10마리가 생존하였다. 이를 통해 백운풀 추출물이 생쥐에 미치는 독성 영향이 거의 없음을 확인 하였다 (표 9).

표 9. 유전적 비만생쥐 모델에서 백운풀 추출물 투여에 따른 독성 검사 결과.

	대조군 (ob/ob mouse)	실험군 (ob/ob mouse + 백운풀 300 mg)
독성시험에 사용된 마리 수	10	10
8주차 생존한 마리 수	10	10
생존률 (%)	100	100

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여

당초목표		당초연구목표 대비 연구결과
1. 백운풀로부터 체중조절용 기능성 소재 개발을 위한 지표성분 설정 및 분석방법의 개발 (1세부)	① 백운풀 추출물로부터 활성성분의 획득 및 구조동정	<ul style="list-style-type: none"> 백운풀 에탄올 추출물로부터 총 8종의 화합물이 분리 및 구조동정 되었음 (digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, ursolic acid, (E)/(Z)-6-O-p-coumaroyl scandoside methyl ester, asperuloside, geniposide, daphylloside, (E)/(Z)-6-O-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester). Anthraquinone 2종, triterpenoid 1종 및 iridoid glucoside 5종. 화합물의 구조와 AMPK 활성 간의 상관관계 탐색을 위해 구입 및 유기합성을 통한 1종의 anthraquinone 계통 화합물을 수집.
	② 지표성분의 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> 백운풀의 품질표준화를 위한 지표성분으로 digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, (E)-6-O-p-coumaroyl scandoside methyl ester, (E)-6-O-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester를 선정하였으며, 이들에 대한 HPLC 분석법을 개발하였음. 기존에 알려진 방법에 비하여 분석시간이 20분 이상 단축되어 경제적 효율성을 보임.
	③ 지표성분의 validation	<ul style="list-style-type: none"> 4종의 지표성분에 대한 검량선을 작성하고, 검출한계, 검량한계, 재현성, 일내 및 일간 정밀성·정확성 등을 조사하였음. 백운풀의 항비만 치료제로서의 제품화 및 품질관리에 기여할 수 있을 것으로 판단됨.
2. 백운풀의 체중조절 효능 평가 및 작용기작 규명 (2세부)	④ 활성성분의 AMPK 활성 분석	<ul style="list-style-type: none"> 분리된 8종의 화합물 중 ursolic acid, digitolutein, 2-hydroxy-3-methylanthraquinone이 AMPK 인산화에 효과가 있는 것으로 조사되었음. 3종의 활성화합물을 대상으로 AMPK의 상·하위 메커니즘에 대한 작용기작을 조사하였음. 수집된 15종의 anthraquinone 화합물에 대한 AMPK 활성을 비교하여 구조-활성 상관관계를 밝혔다.
	⑤ 체지방 증가 억제 및 혈중 지질 저하 효과에 대한 동물실험	<ul style="list-style-type: none"> 비만 생쥐모델 (ob/ob mouse)에 백운풀 추출물을 경구투여한 결과, 대조군에 비해 체중, 간중량/체중 비, 먹이 섭취량 및 복부 체지방이 유의적으로 감소하였음.
	⑥ 실험동물 수준에서의 각종 혈액수치 및 지방조직 변화조사	<ul style="list-style-type: none"> 백운풀 추출물 투여군에서 혈당량 감소효과가 관찰되었으며, 혈액 내 총 콜레스테롤 및 중성지방 수치가 효과적으로 감소하였음. 백운풀 추출물에 의해 간조직 내 지방량이 감소되었으며, 췌장 내 islet이 정상적인 형태로 나타나는 것이 관찰되었음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 천연물 의약품 시장 규모는 약 3,500 억원 (식약청 2001년 자료) 시장규모로 추정되고 있으며, 향후 국내 제약 및 바이오업체의 경쟁력 확보에 도움을 줄 수 있는 유망산업으로 인식되고 있음. 따라서 백운풀 중의 활성 분획 또는 성분을 이용하여 천연물의약품 소재로 활용할 수 있을 것으로 판단됨.
2. 천연물 의약품 시장 규모가 커짐에 따라 약용식물의 산업화를 위해서는 품질표준화를 통한 품질관리가 필요하게 되었음. 실제로 국내산 백운풀은 외형이 유사한 중국산 산방화이초와 구별없이 혼용하여 연구재료로 사용하고 있는 실정임. 이번 연구를 통한 백운풀 지표성분의 설정 및 분석법 개발은 앞으로 항비만 치료제로서의 제품화 및 품질관리에 기여할 수 있을 것으로 판단됨.
3. 백운풀로부터 Ob/Ob mice 수준에서의 백운풀의 항비만 효과를 평가하기 위하여 1차적으로 에탄올 추출물을 투여하였음. 3년의 연구기간 동안 분리된 8종의 화합물 중 ursolic acid, digitolutein 및 2-hydroxy-3-methylanthraquinone 등의 3종이 AMPK 인산화를 유도할 수 있는 것으로 확인되었음. 따라서 비만생쥐모델 수준에서 관찰된 백운풀 에탄올 추출물의 항비만 효과는 이들 3종의 화합물로부터 기인했을 가능성이 있을 것으로 판단, 유기합성 등을 통해 대량확보 후 화합물 수준으로 Ob/Ob mice에 투여할 계획임. 아울러 본연구의 목적은 의약품개발이 아님. 따라서 단일성분으로 건강기능식품개별인정 허가를 받을 수 없으므로 에탄올 추출물에 대한 동물실험을 수행하는 것이 매우 타당함. 또한 농림부와 국내 농업인에 의하여 발굴/재배되고 있는 백운풀에 체중조절 기능성을 부여함으로써 토종 식물자원의 부가가치를 높이고 이를 경제작물로 농가에 보급할 수 있을 것으로 판단됨.
4. 야생에서 적은 개체수로 존재하던 백운풀을 일반 농가에서도 손쉽게 재배할 수 있도록 대도농산 도종목 대표가 재배법을 개발하여 백운풀 생산이 용이해짐에 따라 항비만 활성을 지닌 백운풀을 새로운 경제작물로서 농가에 보급하는 일은 큰 어려움이 없을 것으로 판단됨. 그러나 백운풀 추출물 및 그 구성성분의 항비만 활성에 대한 지적재산권 취득을 시발점으로 한 제품개발을 위해서는 백운풀의 품질표준화가 필수적이며, 이번 연구를 통해 확립된 4종의 백운풀 지표성분 분석법으로 효율적인 품질관리가 이뤄질 수 있을 것으로 기대됨. 이와 더불어 KGLP 인증기관 독성평가 및 임상시험이 성공적으로 수행된다면 체중조절용 건강기능식품으로 백운풀은 식품공전에 미등재되어 있으므로 식품공전 등록에 필요한 서류를 준비하거나, 또는 후속연구를 통해 체중조절용 건강기능식품으로 개별인정 받은 후, 식품 관련 대기업을 통한 정확한 시장조사 및 제품홍보 전략을 모색하여 고부가 제품화 할 수 있음.
5. AMPK activator는 비만 뿐 아니라 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 심장 질환 등 다양한 질병과 관련이 있으므로 백운풀에서 얻어진 유효성분을 기초로 하여 상기 질병의 예방, 치료제로 개발 및 활용할 수 있음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 논문검색

가. Qualitative analysis of the chemical constituents in *Hedyotis diffusa* by HPLC-TOF-MS. *Nat. Prod. Res.* 2012; 26(2): 167-172.

: 백운풀에 포함되어 있는 화합물의 분석법을 개발하기 위하여 high performance liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry (HPLC-TOF-MS) 방법을 이용하였음. 실험결과를 reference compound의 retention time 및 mass spectrometry 데이터를 비교/분석하여 화합물을 동정하였음. 검출된 화합물들 중 9종은 동정되었으며, 대부분 iridoid에 속하는 것으로 확인되었음.

나. Two new iridoid glucosides from *Hedyotis diffusa*. *Fitoterapia.* 2010; 81(6): 515-517.

: 백운풀로부터 2종의 iridoid glucoside (diffusoside A와 B)를 분리하였음. SMMC-7721, SW480, SW620, Bel7402 및 HepG2 세포에 대해서는 세포독성이 나타나지 않았음.

2. 특허검색

가. 백운풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간질환의 예방 또는 치료용 조성물

(1) 출원번호: 10-2011-0016416

(2) 출원일자: 2011년 02월 24일

(3) 출원인: 인제대학교 산학협력단

(4) 발명자: 김정인 외 6명

(5) 요약: 백운풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비알콜성 지방간질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것임. 백운풀 추출물은 혈청 내 ALT 활성을 감소시키고, 또한 간조직의 중성지방 함량을 유의적으로 감소시킬 수 있으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 비알콜성 지방간질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음. 특히 이러한 백운풀 추출물은 천연물질로서, 한방으로 널리 쓰이는 약재에 해당하므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적으로 사용에도 안전한 이점을 가짐.

제 7 장 연구시설·장비 현황

: 해당사항 없음.

제 8 장 참고문헌

- 1) Inhibitory effect on TNF α -induced IL-8 production in the HT29 cell of constituents from the leaf and stem of *Weigela subsessilis*. *Arch. Pharm. Res.* 2005; 28(10): 1135-1141.
- 2) A new phloroglucinol derivative and other constituents from *Eucalyptus globulus* Labill. *ARKIVOC* 2007; 15: 281-291.
- 3) Evaluation of human neutrophil elastase inhibitory effect of iridoid glucosides from *Hedyotis diffusa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20(2): 513-515.
- 4) Studies on constituents of *Oldenlandia diffusa*. *Zhongguo Zhongyao Za Zhi* 2007; 32(7): 590-593.
- 5) Preparation of naturally occurring anthraquinones. *Synthetic Comm.* 1996; 26(1): 49-62.
- 6) Iridoids, flavonoids and monoterpene glycosides from *Galium verum subsp. verum*. *Turk. J. Chem.* 2006; 30(4): 525-534.
- 7) Chemical constituents of *Galium tor tumense*. *Turk. J. Chem.* 2006; 30(4): 515-523.
- 8) Iridoids from *Hedyotis diffusa*. *J. Nat. Prod.* 1991; 54(1): 254-256.
- 9) Simultaneous determination of anthraquinones in *Hedyotis diffusa* by LC coupled with UV detection. *Chromatographia* 2009; 70(1-2): 211-215.

주 의

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

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 백운풀로부터 AMPK 활성화물질을 이용한 체중조절용 기능성 소재 개발				
	(영문) Development of anti-obesity material having AMPK activating effect from <i>Hedyotis diffusa</i>				
주관연구기관	경북대학교		주 관 연 구 자	(소속) 경북대학교 약학대학	
참 여 기 업	대도농산, 에이씨티		책 임 자	(성명) 송 경 식	
총연구개발비 (410,000 천원)	계	410,000	총 연구 기간	2010. 07. 01 ~ 2013. 06. 30 (3 년)	
	정부출연 연구개발비	300,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인원	15
	기업부담금	100,000		내부인원	10
	연구기관부담금	10,000		외부인원	5

○ 연구개발 목표 및 내용

1. 백운풀로부터 체중조절용 기능성 소재 개발을 위한 지표성분 설정 및 분석방법의 개발
 - 각종 크로마토그래피를 이용한 활성성분의 획득
 - NMR 등 각종 기기분석을 이용한 활성성분의 동정
 - HPLC/LC-MS 등을 이용한 지표성분의 분석법 개발
 - 분석방법의 validation (정확성, 정밀성, LOD, LOQ 등)
2. 백운풀의 체중조절 효능 평가 및 작용 기작 규명
 - 백운풀 추출물에 함유된 AMPK 활성화 지표물질 분리과정 중 AMPK 활성화도 분석
 - 백운풀 추출물의 체지방 증가 억제 및 혈중 지질 저하효과에 대한 동물실험
 - 백운풀 추출물의 투여에 따른 실험동물 수준에서의 각종 지방조직 변화조사
 - 백운풀 추출물의 인체에 대한 최적 투여 용량설정을 위한 반복 동물실험

○ 연구결과

1. 백운풀 추출물로부터 AMPK 활성화 물질을 탐색하기 위한 화합물의 분리 및 구조동정을 실시한 결과 anthraquinone 2종, triterpenoid 1종 및 iridoid glucoside 5종을 분리하였음 이들 중 ursolic acid, digitolutein, 2-hydroxy-3-methylantraquinone으로부터 AMPK 활성을 발견하였음.
2. 백운풀 구성성분 중 ursolic acid를 포함한 anthraquinone 계통의 화합물로부터 항비만 활성이 발견됨에 따라, 15종의 anthraquinone류를 대상으로 구조-활성 상관관계를 탐색하였음. 그 결과 대체적으로 가장 기본 골격인 anthraquinone에 가까울수록 AMPK 활성이 높은 경향을 보였고, 추가적인 functional group이 많을수록 AMPK 활성이 낮아지는 것을 확인하였음.
3. 분리된 8종의 화합물 중 4종의 digitolutein, 2-hydroxy-3-methylantraquinone, (E)-6-O-p-coumaroyl scandoside methyl ester 및 (E)-6-O-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester를 지표성분으로 설정하고, 그들에 대한 분석법을 개발하여 validation을 실시하였으며, 이러한 결과는 백운풀의 항비만 치료제의 제품화 및 품질관리에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단됨.
4. 백운풀 추출물의 항비만 효과로서 체중감량, 지방간 조절 효과 및 혈중 콜레스테롤 저해 등의 효과를 확인하였음. 또한 항당뇨 효과로서 혈당량 감소 및 췌장 내 islet 조직을 정상화 시키는 등의 효과를 확인하였음. 독성시험을 통해 백운풀 추출물이 생쥐 생존율에 미치는 영향이 거의 없음을 확인하였음.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 향후 식품의약품안전처로부터 건강기능성 식품 및 천연물신약으로 공식인정을 받기 위하여 후속적인GLP 독성 및 임상연구에 필요한 세포 및 동물효능 자료를 확보하였음.
2. 후속연구를 통해 실제 백운풀 추출물의 비만 및 항당뇨 효과를 실용화 하는데 필수적인 기초 작용기전을 규명하였음.

[별첨 2]

자체평가 의견서

연구개발분야	천연물화학	과제구분	<input type="checkbox"/> 지정공모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	110016-4
연구과제명	백운폴로부터 AMPK 활성화물질을 이용한 체중조절용 기능성 소재 개발				
주관연구기관	경북대학교				
연구담당자	주관연구책임자	송 경 식			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	경북대학교	성 명	송 경 식
		기관(부서)	경북대학교	성 명	허 태 린
		기관(부서)		성 명	
기관(부서)			성 명		
연구기간	총 기 간	2010.07.01. - 2013.06.30.		당해년도기간	2012.07.01. - 2013.06.30.
연구비(천원)	총 규 모	410,000 천원		당해년도규모	150,000 천원

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행 계획대로 진행 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음 어느 정도 얻음 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다 약간 감소되었다 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오.

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

연구 결과를 농촌 소득증대에 연결시키기 위해서는 건강기능성식품 및 천연물신약으로 개발하는 것이 절대적으로 필요하다. 이를 위해서는 독성시험 및 인체효능시험 등의 관련 후속연구가 필요하다고 판단된다. 현 과제를 수행하는 과정에서 비만 및 당뇨 동물모델의 구입비를 산정할 때, 연구비 규모가 보다 현실화되어야만 한다고 생각된다.

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족 보통 미흡

(근거 : _____)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

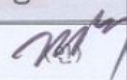
- 확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

현재 현행법상 효능을 공식적으로 명시하기 위해서는 GLP 공식 독성시험과 인체 효능연구 및 임상연구가 이뤄져야만 하지만 연구기간 및 연구예산의 제약으로 인해 시행 할 수 없었음. 추후 이와 관련된 연구가 수행될 경우에만 기업화가 가능하다고 판단됨.

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	경북대학교	교 수	송 경 식 
참여기업대표	대도농산	대표이사	도 종 목 (인)
참여기업대표	에이씨티	대표이사	이 보 섭 (인)

2. 연구목표 대비 결과

당초목표		당초연구목표 대비 연구결과
1. 백운풀로부터 체중조절용 기능성 소재 개발을 위한 지표성분 설정 및 분석방법의 개발 (1세부)	① 백운풀 추출물로부터 활성성분의 획득 및 구조동정	<ul style="list-style-type: none"> 백운풀 에탄올 추출물로부터 총 8종의 화합물이 분리 및 구조동정 되었음 (digitolutein, 2-hydroxy-3-methylantraquinone, ursolic acid, (E)/(Z)-6-O-p-coumaroyl scandoside methyl ester, asperuloside, geniposide, daphylloside, (E)/(Z)-6-O-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester). Antraquinone 2종, triterpenoid 1종 및 iridoid glucoside 5종. 화합물의 구조와 AMPK 활성 간의 상관관계 탐색을 위해 구입 및 유기합성을 통한 1종의 anthraquinone 계통 화합물을 수집.
	② 지표성분의 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> 백운풀의 품질표준화를 위한 지표성분으로 digitolutein, 2-hydroxy-3-methylantraquinone, (E)-6-O-p-coumaroyl scandoside methyl ester, (E)-6-O-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester를 선정하였으며, 이들에 대한 HPLC 분석법을 개발하였음. 기존에 알려진 방법에 비하여 분석시간이 20분 이상 단축되어 경제적 효율성을 보임.
	③ 지표성분의 validation	<ul style="list-style-type: none"> 4종의 지표성분에 대한 검량선을 작성하고, 검출한계, 검량한계, 재현성, 일내 및 일간 정밀성·정확성 등을 조사하였음. 백운풀의 항비만 치료제로서의 제품화 및 품질관리에 기여할 수 있을 것으로 판단됨.
2. 백운풀의 체중조절 효능 평가 및 작용기작 규명 (2세부)	④ 활성성분의 AMPK 활성 분석	<ul style="list-style-type: none"> 분리된 8종의 화합물 중 ursolic acid, digitolutein, 2-hydroxy-3-methylantraquinone이 AMPK 인산화에 효과가 있는 것으로 조사되었음. 3종의 활성화합물을 대상으로 AMPK의 상·하위 메커니즘에 대한 작용기작을 조사하였음. 수집된 15종의 anthraquinone 화합물에 대한 AMPK 활성을 비교하여 구조-활성 상관관계를 밝혔다.
	⑤ 체지방 증가 억제 및 혈중 지질 저하 효과에 대한 동물실험	<ul style="list-style-type: none"> 비만 생쥐모델 (ob/ob mouse)에 백운풀 추출물을 경구투여한 결과, 대조군에 비해 체중, 간중량/체중 비, 먹이 섭취량 및 복부 체지방이 유의적으로 감소하였음.
	⑥ 실험동물 수준에서의 각종 혈액수치 및 지방조직 변화조사	<ul style="list-style-type: none"> 백운풀 추출물 투여군에서 혈당량 감소효과가 관찰되었으며, 혈액 내 총 콜레스테롤 및 중성지방 수치가 효과적으로 감소하였음. 백운풀 추출물에 의해 간조직 내 지방량이 감소되었으며, 췌장 내 islet이 정상적인 형태로 나타나는 것이 관찰되었음.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	백운풀의 AMPK 활성화 능 검증 기술 및 이의 비만, 당뇨 치료용 조성물로의 이용 기술
②	백운풀 중 활성 성분의 분리, 정제 기술
③	백운풀 중의 지표성분 분석 기술
④	백운풀의 체중조절, 또는 비만용 건강기능식품 기반 기술

4. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	특허 출원	산업제이전 (상품화)	현장으로 해	정책 자료	기타
①의 기술	V					V				
②의 기술					V					논문
③의 기술	V									논문
④의 기술	V					V				

* 각 해당란에 v 표시

5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 천연물 의약품 시장 규모는 약 3,500 억원 (식약청 2001년 자료) 시장규모로 추정되고 있으며, 향후 국내 제약 및 바이오업체의 경쟁력 확보에 도움을 줄 수 있는 유망산업으로 인식되고 있음. 따라서 백운풀 중의 활성 분획 또는 성분을 이용하여 천연물의약품 소재로 활용할 수 있을 것으로 판단됨.
②, ③의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 천연물 의약품 시장 규모가 커짐에 따라 약용식물의 산업화를 위해서는 품질표준화를 통한 품질관리가 필요하게 되었음. 실제로 국내산 백운풀은 외형이 유사한 중국산 산방하이초와 구별없이 혼용하여 연구재료로 사용하고 있는 실정임. 이번 연구를 통한 백운풀 지표성분의 설정 및 분석법 개발은 앞으로 항비만 치료제로서의 제품화 및 품질관리에 기여할 수 있을 것으로 판단됨.
④의 기술	<ul style="list-style-type: none"> 백운풀의 생리활성 성분으로 밝혀진 ursolic acid, digitolutein 및 2-hydroxy-3-methylanthraquinone에 대해서 추가적인 작용기전을 밝힌다면 농림부와 국내 농업인에 의하여 밭갈/채배되고 있는 백운풀에 체중조절 기능성을 부여함으로써 토종 식물자원의 부가가치를 높이고 이를 경제작물로 농가에 보급할 수 있을 것으로 기대됨. KGLP 인증기관 독성평가 및 임상시험이 성공적으로 수행된다면 체중조절용 건강기능식품으로 개별인정을 획득하여 고부가 제품화 할 수 있음. AMPK activator는 비만 뿐 아니라 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 심장 질환 등 다양한 질병과 관련이 있으므로 백운풀에서 얻어진 유효성분을 기초로 하여 상기 질병의 예방, 치료제로 개발 및 활용할 수 있음.

