

발간등록번호

11-1543000-001029-01

콜레스테롤 대사와 경화성 혈관질환 퇴치를 위한  
차즈기 이용 기술 개발에 관한 연구

(Technical development with a *Perilla frutescens* Britton  
*var. acuta* Kudo targeting adverse cholesterol metabolism  
and atherosclerotic diseases)

한림대학교

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “콜레스테롤 대사와 경화성 혈관질환 퇴치를 위한 차즈기 이용 기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 11월 16일

주관연구기관명 : 한림대학교

주관연구책임자 : 강영희

1세부연구책임자 : 강영희

2세부연구책임자 : 이재용

협동연구기관명 : 다하누

협동연구책임자 : 이세원

# 요 약 문

## I. 제 목 :

콜레스테롤 대사와 경화성 혈관질환 퇴치를 위한 차즈기 이용 기술 개발 에 관한 연구

## II. 연구성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자 등록	논문		기타
	출원	등록	품종 명칭등 등록	품종생 산 수입관 매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표							1	1	
	달성	1						2	2	
2차 년도	목표	1						2	1	
	달성	1						1		
3차 년도	목표	2	1					3	1	시제품
	달성	2	1					1		시제품 완성
계	목표	3	1					6	3	
	달성	3	1					4	2	

## III. 연구개발의 목표

- 선행연구로 진행한 꿀풀과의 식물인 차즈기(*Perilla frutescens Britton var. acuta Kudo*)를 선도소재로 하여 콜레스테롤 대사와 관련 경화성 혈관질환에 대한 예방 및 치료를 위한 기능성 식품소재로서의 가능성을 타진하고 기전적인 역할을 규명하여 건강기능성 식품으로 개발하고자 함.
- 따라서 본 연구에서는 1) 콜레스테롤의 유출기전을 촉진하는 차즈기의 유효 성분의 기전적 탐색, 2) 콜레스테롤 유출과 관련한 활성 물질에 대한 안정적인 추출 및 분리법을 확보하여 유효 성분의 구조를 규명, 3) 탐색된 유효 성분을 바탕으로 in vitro와 in vivo에서 연구를 통한 콜레스테롤 생합성 및 조절 기전의 효능을 규명하여, 차즈기 소재의 경화성 혈관질환의 예방과 치료에 대한 효능 극대화 및 건강기능식품 소재로의 활용 가능성을 평가입증함.
- 궁극적으로는 국산 품종의 차즈기 품종 개량 및 건강기능 식품소재의 개발 및 이를 활용하여 유통 가능한 차즈기 추출물이 첨가된 일반식품 개발 및 다양한 상품화를

추진하고자 함.

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

##### 1. 고콜레스테롤혈증으로 인한 경화성 혈관질환 개선을 위한 차즈기 소재 개발 (제1세부-한림대학교, 강영희)

- 1) 대식세포를 이용한 in vitro 실험에서 콜레스테롤이 축적된 거품세포에서 콜레스테롤 유출과 관련한 바이오마커인 ABCA1 활성화와 거품세포의 형성 지연 및 억제하는 차즈기 유효성분 탐색
- 2) 유출된 콜레스테롤이 apoA-1과 결합하여 HDL으로의 형성·전환에 대한 관련 기전적인 역할 규명
- 3) 동맥경화증의 대표적인 동물모델인 apoE 유전자 결여 마우스를 사용하여 차즈기 소재를 이용한 경화성 혈관질환 치료와 예방에 대한 in vivo 기전적인 효능 검증

##### 2. 차즈기 소재의 콜레스테롤 생합성 및 흡수 저해활성 평가 (제2세부-한림대학교, 이재용)

- 1) in vitro 실험으로 차즈기 소재의 장 내피세포에서 콜레스테롤 흡수 및 합성 저해능 확인과 관련 기전적인 역할 규명
- 2) 고콜레스테롤식이를 제공한 실험동물에서 콜레스테롤 수치의 개선과 간조직에서 콜레스테롤 합성 효소인 HMG-CoA reductase와 ACAT의 효소 활성 저해능 확인과 기전적인 효능 검증
- 3) 콜레스테롤 개선 효능을 바탕으로 건강기능식품 소재로의 개발 가능성 부여

##### 3. 제품의 표준화, 기준규격 설정 및 안정성 평가 및 차즈기 소재의 추출물 및 분획물의 유기화학적 분석 및 유효성분의 구조 규명 (협동세부-다하누, 이세원)

- 1) 원료의 구성성분 Pattern 분석(산화 LDL로 유도된 거품세포의 형성을 감소시키는 Hexane분획물의 Pattern 확인)
- 2) 차즈기의 추출물로부터 콜레스테롤의 유출 기전을 촉진하는 지표 물질 추적 및 분리  
-각 세부과제들과 긴밀히 연계하여 active-principle에 의거한 활성성분 추적 및 분리  
-HPLC, biotage, Silica gel 등의 칼럼크로마토그래피로 분리정제 한 후 NMR(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR, COSY, DEPT, HMQC 및 HMBC)을 이용하여 활성 물질의 정확한 구조 규명
- 3) 활성 분획물(Hexane)의 대량 추출법 확립  
-RSM (반응표면분석)을 활용한 최적추출 조건 확립(Sonication, 침출, Reflux 추출 조건의 시간, 용매, 수율 배합 비율 확인)  
-각 세부과제에 시료 제공
- 4) 제품의 표준화 연구

- 유통기한 평가
- 관능평가

## V. 연구개발결과

### 1. 제1세부 : 고콜레스테롤혈증으로 인한 경화성 혈관질환 개선을 위한 차즈기 소재 개발

- 1) 선행연구로서의 배암차즈기 추출물의 산화 LDL 유입 및 유출에 대한 효과와 유출된 콜레스테롤의 HDL로 전환과정에서의 과정 확인
- 2) 중국산 차즈기의 MeOH 추출물에서 hexane 분획물의 효능을 거품세포의 형성 및 콜레스테롤 유출 정도를 통해 효능 확인
- 3) 중국산 차즈기의 MeOH 추출물에서 hexane 분획물의 효능을 콜레스테롤 유출을 유도하는 다양한 transcription factor와 연관성을 통해 확인
- 4) hexane 분획물에서 콜레스테롤 유출에 효능을 가지는 단일 유효 성분인  $\alpha$ -asarone 스크리닝
- 5) 중국산 차즈기의 MeOH 추출물에서 hexane 분획물의 효능을 소포체 스트레스를 통해 확인
- 6) 중국산 차즈기의 MeOH 추출물에서 hexane 분획물의 효능을 소포체 스트레스로 매개되는 세포사멸 억제 효능 확인
- 7) hexane 분획물에서 분리한 단일 유효 성분인  $\alpha$ -asarone의 효능을 소포체 스트레스로 매개되는 세포사멸 억제 효능 확인
- 8) hexane 분획물에서 분리한 단일 유효 성분인  $\alpha$ -asarone의 효능을 대식세포 autophagy를 통해 확인
- 9) 중국산 차즈기의 hexane 분획물 이외의 methyl chloride 분획물에서 소포체 스트레스에 대한 효능 확인
- 10) 차즈기 추출물과  $\alpha$ -asarone의 apoE KO mouse에서 혈청 지질 성분의 조절 및 RCT 관련 바이오마커를 통한 효능 확인

### 2. 제2세부 : 차즈기 소재의 콜레스테롤 생합성 및 흡수 저해활성 평가

- 1) 중국산 차즈기 MeOH 추출물의 장 내피세포 (CaCo-2)에서 콜레스테롤 흡수 저해 효능 확인
- 2) 중국산 차즈기 추출물에서 ethyl acetate와 methyl chloride 분획물에서의 콜레스테롤 흡수 저해 효능 확인
- 3) 중국산 차즈기 추출물에서 ethyl acetate 분획물에서 HMG-CoA reductase의 활성 억제 효능 확인

### 3. 협동세부: 제품의 표준화, 기준규격 설정 및 안정성 평가 및 차즈기 소재의 추출물 및 분획물의 유기화화적인 분석 및 유효성분의 구조 규명

- 1) 차즈기의 추출방법 및 TLC와 HPLC로의 유효 성분 분포 확인

- 2) 차즈기 추출물의 hexane 분획물에서 MS와 biotage를 통한 유효 성분 분리방법 확인
- 3) 차즈기 추출물의 ethyl acetate 분획물에서 NMR을 이용한 유효 성분의 분리 및 구조 확인
- 4) 차즈기 추출물의 water 분획물에서 MS와 Diaion HP-20을 이용한 분석 방법 확인
- 5) 차즈기 추출물의 hexane 분획물에서 NMR을 통한 단일 유효 성분 ( $\alpha$ -asarone) 분석 및 구조 규명
- 6) 활성 추출 분획물의 대량 추출법을 sonication과 침출, reflux, RSM을 통해 확립
- 7) 차즈기 추출물의 기능성분 표준화와 지표성분의 설정
- 8) 차즈기의 건강기능식품 개발 추진 및 제품화 공정 개발
- 9) 차즈기 추출물의 methyl chloride 분획물에서 소포체 스트레스에 효능을 가지는 유효 성분 분리를 위한 NMR 작업 표준화
- 10) 제품의 안정성 평가를 가속시험으로 확인 및 다양한 제형으로 제품화 선호도 확인
- 11) 관능평가의 결과를 토대로 차즈기와 수국차의 혼합차 제형으로의 개발

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구개발 성과

#### 1) 논문

- Park et al., Sage weed (*Salvia plebeia*) extract antagonizes foam cell formation and promotes cholesterol efflux in murine macrophages, 2012, Int J Mol Med, 30(5): 1105-1112.
- Paek et al., Rapid identification of aldose reductase inhibitory compounds from *Perilla frutescens*, 2013, Biomed Res Int, 2013: 679463.
- Park et al., Purple perilla extracts allay ER stress in lipid-laden macrophages, 2014, PLoS One, 9(10): e110581.
- Park et al., Purple perilla extracts with  $\alpha$ -asarone enhance cholesterol efflux from oxidized LDL-exposed macrophages, 2015, Int J Mol Med, 35(4):957-965.

#### 2) 특허

- 출원번호 : 10-2013-0007899, 차즈기차, 이의 제조방법, 차즈기차 추출물을 포함하는 음료 조성물, 및 이의 제조방법.
- 등록번호 : 10-1470993, 차즈기차, 이의 제조방법, 차즈기차 추출물을 포함하는 음료 조성물, 및 이의 제조방법.
- 출원번호 : 10-2015-0077595, 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법.
- 출원번호 : 10-2015-0129495, 차즈기 추출물 또는 알파-아사론을 함유하는 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물 및 치료용 약학 조성물

### 3) 인력양성

- 본 연구과제에 참여를 통해 차즈기의 추출 및 유효 성분 분리법과 항동맥경화성 및 콜레스테롤 저하에 대한 기능성 평가 기술에 대한 전문 인력으로 배출

#### -박사 2명

강민경-한림대학교 식품영양학과 BK21플러스 post doc. 취업

김정현-한림대학교 천연의학연구소 연구원 취업

#### -석사 7명

김민수-(주)휴젤 연구원 취업

김윤호-한림대학교 식품영양학과 박사과정 진학

박신혜-한림대학교 식품영양학과 박사과정 진학

백지훈-(주)태경농산 연구원 취업

이은정-한국식품연구원 취업

조인희-(주)와이디생명과학 연구원 취업

한선영-한림대학교 식품영양학과 박사과정 진학

### 4) 언론홍보

- 2015년 농림수산물기술기획평가원에서 주최한 킨텍스에서 열린 『기술수요자와 공급자간 만남의 장』이라는 타이틀로 농식품 기술이전 설명회에서 본 연구팀이 ‘차즈기차 제조 및 이를 활용한 음료조성물 제조방법’ 기술의 내용을 홍보함.

-많은 농가를 포함한 농업조합, 또한 음료 업체 등에서의 기술이전에 대한 관심을 받는 기회가 되었으며, 향후 차즈기 소재의 다양한 활용성을 기대해 볼 수 있음.

### 5) 교육지도

- 한림대학교에서 다하누(주)로 분기별 1회 단위를 거쳐 각각의 내용을 기술지도함

1) 차즈기 추출물 제조 및 분리 방법

2) 차즈기 추출물의 항동맥경화성 기능 물질 효능

3) 차즈기 추출물의 콜레스테롤 저하 효능

4) 차즈기 추출물에서의 혈관 강화 개선용에 대한 유효 성분 지표 확인 및 분리 방법 확인

5) 유효 성분의 대량화 공정 적용 가능성 제시

6) 차즈기차 제조를 위한 효능 극대화 및 제조법 표준화

### 6) 시제품

- 본 연구를 진행하면서 차즈기 소재의 항죽상동맥경화 및 콜레스테롤 저하 효능에 대한 연구 결과를 토대로 다하누와 한림대학교 명의로 차즈기차를 시제품으로 제작함.  
차즈기차의 분획별 효능을 확인하여 최적의 조건을 확립하고, 해당 분획의 대량 생산을 통해 관능 평가 후, 티백으로 제조 및 티백들을 고급형 지관통에 넣어 포장함으로써 ‘차즈기’소재의 고부가가치소재로서의 활용성 다양화를 추구함.

## 2. 현재 진행중인 연구성과

### 1) 논문

- 'Antioxidant activity and optimization of condition for extraction of a HPLC method for the analysis of  $\alpha$ -asarone from *Perilla frutescens*' 논문을 최종 교정 중에 있으며 교정 완료 후 International Journal of Food Science and Technology 저널에 게재 예정
- 'Dietary compound  $\alpha$ -asarone alleviates ER stress-mediated apoptosis in  $7\beta$ -hydroxycholesterol-challenged macrophages' 투고 (Molecular Nutrition & Food Research)되어 revision 중에 있음.
- 'Cholesterol-lowering effect of polyphenols from *Perilla Frutescens* in hypercholesterolemia rat induced by high cholesterol diet' 투고 (Food Research International)되어 심사 중에 있음.
- 'Ultrafiltration liquid chromatography for screening and isolating potential xanthine oxidase inhibitors from *Perilla frutescens*' 논문을 작성 중에 있으며 마무리 단계에 있어 2015년 12월내에 투고 할 계획임.
- 'Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of *Perilla frutescens*' 논문을 data 확보 중에 있으며 데이터 확보 후 논문을 완성하여 2015년 12월내에 투고 할 계획임.
- ' $\alpha$ -Asarone prevents advanced atherosclerosis by promoting autophagy in oxysterol-laden macrophages'의 data 확보를 마무리하여 2015년 12월내에 투고 할 계획임.

### 2) 특허

- '항산화 활성이 우수한 차즈기 및 수국 잎의 비올별 제조방법과 이를 유효성분으로 하는 차즈기-수국 티백 및 기능성 음료 제조방법'에 대한 특허를 진행 중에 있으며 수일 내에 특허 출원을 할 계획임.
- 현재 진행중인 차즈기 추출물의 MC fraction에 대한 효능의 data를 수집하여 '차즈기 추출물의 MC 세부 fraction의 혈관 강화용 기능성 조성물'에 대한 내용으로 2015년 12월에 출원할 계획임.
- '혈중 콜레스테롤 감소활성이 우수한 차즈기유래 천연물'출원 준비 중

### 3) 기술이전

'차즈기차, 이의 제조방법, 차즈기차 추출물을 포함하는 음료 조성물 및 이의 제조방법'에 대한

### 전용실시권 기술이전 계획

‘항산화 활성이 우수한 차즈기 및 수국 잎의 비올별 제조방법과 이를 유효성분으로 하는 차즈기-수국 티백 및 기능성 음료 제조방법’에 대한 전용실시권 기술이전 계획

### 3. 연구성과 활용 계획

- 1) 본 과제에서 획득한 콜레스테롤 대사 조절과 경화성 혈관질환의 퇴치에 효능을 가진 차즈기 소재 추출물 및 유효 성분을 이용하여 농가 소득 상승 가치의 소재로써 고소득 작물로서의 활용을 적극 추진
- 2) 차즈기 소재의 경화성 혈관질환 예방과 치료에 대한 검증된 효능을 홍보하여 새로운 건강기능식품의 원료로 상품화를 위한 기술이전 노력
- 3) 효능 극대화의 기술적인 배경과 과학적인 효능을 규명하여 발표한 특허 및 논문 등의 확보된 지식재산권을 이용하여 건강기능식품의 상품화 추진
- 4) 사용된 연구개발 기술을 기반으로 다른 천연물로부터의 동맥경화성 억제효능을 갖는 기능적 소재를 지속적으로 개발하는데 적극적으로 활용

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	1	1		3	1	시제품

## SUMMARY (영문 요약문)

This research project attempted to develop health-related functional foods by sounding and revealing possible mechanistic roles of the Labiatae *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo as a functional food material in the prevention and treatment of cholesterol metabolism and vascular sclerosis-associated diseases based on previous research results. The research aim of the project was as follow: 1) mechanistic investigation of effective compounds of *Perilla frutescens* promoting cholesterol efflux, 2) consistent extraction and separation of active compounds influencing cholesterol efflux and close examination of chemical structures of effective compounds, and 3) evaluation and proof of the effectiveness in the prevention and treatment of sclerosis-associated vascular diseases and the application possibility as health-functional foods of *Perilla frutescens* by exploring cholesterol biosynthesis and regulatory mechanisms of active compounds of *Perilla frutescens* via in vitro and in vivo experiments. Ultimately, this project presented a fine target for developing general foods and a variety of commercial goods and products supplemented with edible perilla extracts by improving domestic variety and better food materials of perilla.

This research project consisted of 3 separate detailed themes: 1) development of perilla materials for the improvement of sclerosis-related vascular diseases due to hypercholesterolemia, 2) evaluation of inhibitory activity of cholesterol biosynthesis and absorption by perilla materials, and 3) perilla product standardization, establishment of standard sizes, safety evaluation, organic chemical analysis of extracts and fractions of perilla materials and examination of chemical structure of its effective compounds.

There were several research outcomes worked out. To date 4 SCI papers were published, 3 different patents applied (1 patent registered and 3 patents pending) and a pilot product produced. This project will publish 5 more SCI papers and 2 more patents within the year of 2015. Based on the good results from these papers and patents this project will provide various follow-up applications and expectations: 1) introduction of perilla extracts and effective compounds targeting cholesterol metabolism and preventing against sclerotic vascular diseases as large earnings-farm products, 2) technical transfer trial for the commercial goods of new functional food materials through advertising benefits of the perilla extracts and effective compounds targeting cholesterol metabolism and preventing against sclerotic vascular diseases, 3) manufacturing expedition of commercial products of health-functional foods by employing secured intellectual properties including publications and patents revealing scientific efficacy and technical background of perilla compounds, and 4) positive application of research technologies and skills used in this project in continuous developments of other functional natural materials inhibiting atherosclerosis.

# CONTENTS

Chapter. 1	Research overview and aim of product .....	12
Chapter. 2	The present state of technical development.....	14
Chapter. 3	The results of research product .....	20
Chapter. 4	The attainment of goals and contributiveness to related area.....	110
Chapter. 5	The products of research development and plan of product application .....	115
Chapter. 6	The overseas scientific technical information .....	118
Chapter. 7	The present state of research installation and machines.....	119
Chapter. 8	The fulfillment product of laboratory safety management .....	120
Chapter. 9	References.....	121
<Atteched>	Report of patents research papers and market analysis	

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표.....	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	20
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	110
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	115
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	118
제 7 장	연구시설·장비 현황.....	119
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적 .....	120
제 9 장	참고문헌 .....	121

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 1. 연구개발과제의 개요

선행연구로 진행한 꿀풀과의 식물인 차즈기(*Perilla frutescens Britton var. acuta Kudo*)를 선도소재로 하여 콜레스테롤 대사와 관련 경화성 혈관질환에 대한 예방 및 치료를 위한 기능성 식품소재로서의 가능성을 타진하고 기전적인 역할을 규명하여 건강기능성 식품으로 개발하고자 함.

본 연구과제에서는

1. 선행연구 결과를 바탕으로 차즈기에서 죽상동맥경화증의 예방 효과가 존재하는지 효능 평가 및 유효 성분을 분석·비교
2. in vitro 연구에서는 거품세포에서의 콜레스테롤 유출 및 유출된 콜레스테롤의 HDL 전환·형성 기전의 활성화를 연구함으로써 콜레스테롤 조절로 인한 죽상동맥경화증의 예방 효과 확인
3. 장 내피세포에서의 콜레스테롤 생합성 및 흡수 저해능에 대한 효능 평가
4. in vitro 연구를 바탕으로 죽상동맥경화증의 대표적인 실험동물 모델인 apoE 유전자 결여 마우스를 사용한 in vivo 연구에서도 콜레스테롤 조절로 인한 죽상동맥경화증의 예방 효능 확인
5. 고콜레스테롤 식이를 제공한 실험동물의 콜레스테롤 수치 개선 및 콜레스테롤 생합성 효소인 HMG-CoA reductase와 ACAT의 활성 저해능 확인
6. 콜레스테롤 개선 효과에 대한 활성 물질을 분리 및 정제하여 구조 규명
7. 추출화합물 및 단리화합물을 대상으로 콜레스테롤 예방에 대한 활성 평가 실시로 인한 물질 선별

궁극적으로 차즈기의 유효 성분이 고콜레스테롤혈증으로 인한 죽상동맥경화증의 예방 효과에 대한 효능 평가 및 활성 물질 규명을 목적으로 한다. 특히, 콜레스테롤 생합성 저해 및 수치 개선으로 인한 효능 평가와 콜레스테롤 조절을 통한 죽상동맥경화증 예방에 대한 기전 활성화 연구를 진행하여 활성 물질을 탐색한다. 이러한 활성을 가지는 추출물에 대한 추출조건 표준화 및 안정화와 단리화합물 및 분리화합물을 최적 조건으로 분리하여 해당 유효 성분에 대한 화학적 구조를 규명한다.

이러한 연구 결과를 바탕으로 차즈기의 죽상동맥경화증 예방에 대한 유효 성분을 탐색 및 안정적인 추출 조건을 확보하여 차즈기를 건강기능식품 소재로서 시제품 개발 및 상품화함으로써 고부가가치를 부여하고 재배 농가의 소득 증대를 모색한다.

2. 성과목표

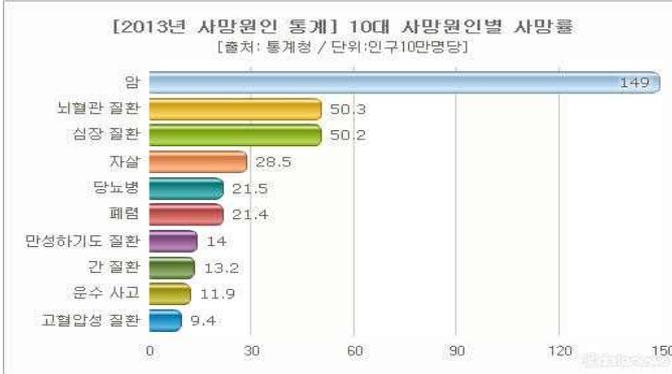
(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				유전자 원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종 명칭 등록	품종 생 수입 관 매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차	년도 목표								1	1	
2차	년도 목표	1							2	1	
3차	년도 목표	2	1						3	1	시제품
계	목표	3	1						6	3	

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내·외 심혈관계 질환 현황

#### 1) 국내 심혈관계 질환 현황



♥ 생활수준의 향상으로 인하여 식생활이 서구화되고 평균수명이 연장되고 있으며, 질병의 양상이 선진국형으로 변모하고 있음. 서구화된 식습관의 변화는 우리나라의 주식이 쌀에서 육류 위주의 식습관으로 변화하여 기름진 동물성 지방의 섭취로 인해 콜레스테롤을 과다 섭취함으로써 고콜레스테롤혈증 유병률이 점차 증가하는 추세임.

♥ 심장마비, 동맥경화, 뇌졸중 등과 같은 순환기 질환은 만성 성인병으로서 의학이 발달하고 수많은 치료제가 계속 나오고 있음에도 불구하고 유병률은 계속 증가하고 있는 추세임.

♥ 통계청에서 발표한 2013년 사망원인 순위 조사에서 10대 사망원인 (총 사망자의 70.1%를 차지)에서 상위 3대 사인 (암, 심장 질환, 뇌혈관질환)으로 인한 사망률은 47.4%로 상위 3대 사인의 비율이 절반정도 차지함으로써 심혈관계 질환은 주요 사망원인으로 부각되고, 2002년 대비 38%가 증가함으로써 중요한 질환으로 인식할 필요가 있음.

♥ 심혈관계 질환은 여성보다는 남성에서 많이 발병하였는데, 최근에는 60대 이상의 여성에게서 유병률이 증가하고 있음. 전체 심장질환 유병률 50.2% 중 60대 이후의 발병률이 약 70%에 달하는 비율을 차지함으로써 평균 기대수명이 연장된 현대사회에 매우 중요한 비중을 차지하는 질환으로 인식되고 있음.

#### <순환기계통 질환의 연령별 사망률, 2013>

(단위 : 인구 10만명)

구 분	10대	20대	30대	40대	50대	60대이상
2013년	7.4	2.3	7.3	23.4	55.4	3109.7

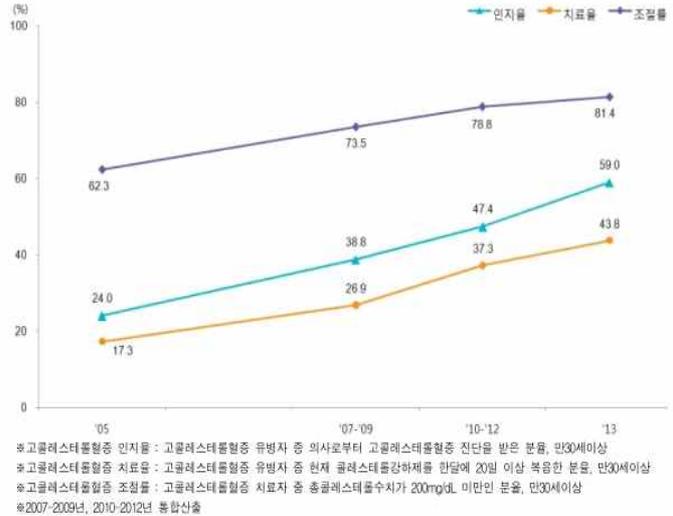
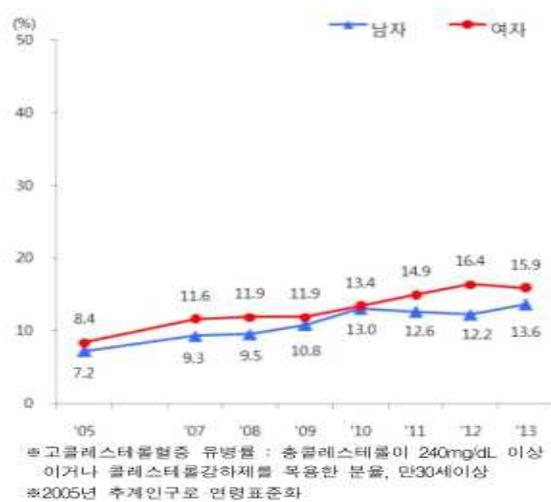
♥ 순환기계통 질환의 연령별 사망률을 토대로 기존에는 고령의 60대 이상의 노인층에서 사망률 높았지만, 최근에는 40대 이후의 중장년층에서도 사망률이 증가하고 있음.

#### <고콜레스테롤혈증 유병률 추이>

♥ 보건복지부에서 발표한 국민건강통계에 의하면 만성질환의 원인 중 고콜레스테롤혈증 유병률 추이를 살펴보면 심장질환 발생의 주요 원인인 고콜레스테롤혈증 유병률이 2005년 8.0%에서 2013년 14.9%로 최근 10년간 약 6.9%p 증가함. 또한 고콜레스테롤혈증 유병률은 남자 13.6%, 여자 15.9%로 여자가 더 높음.

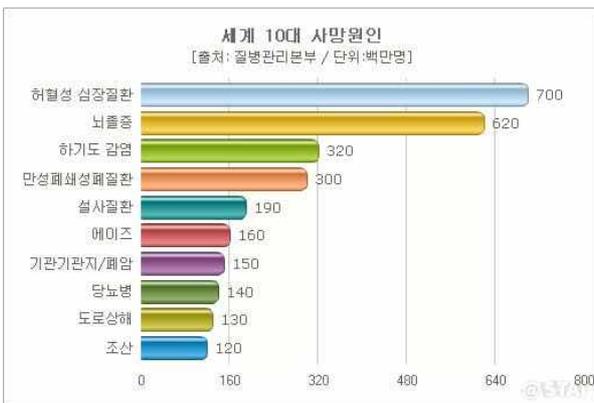
♥우리나라의 고콜레스테롤혈증에 대한 인지도 및 치료·조절의 현황을 살펴보면, 고콜레스테롤혈증에 대한 인지도는 59.0%이나 치료율은 43.8%, 조절률은 37.0%로 이전까지 보다는 증가하였으나 아직까지 **유병 인지도 중 치료자 및 조절자는 절반 이하 수준**임.

♥고콜레스테롤혈증에 의한 동맥경화증, 뇌졸중, 중풍 등은 심각한 사회 문제로 대두되고 있음.



따라서 고콜레스테롤혈증을 억제하고, 경화성 혈관질환을 억제하는 효능을 가지는 기능성식품 개발은 사회·문화적 측면에서 막대한 영향을 미칠것으로 사료됨.

## 2) 국외 심혈관 질환 현황



♥WHO에 따르면 한해 만성질환으로 사망하는 3500만 명 중 50% 이상이 심혈관계 질환으로 사망함. 세계심장협회에서는 운동부족 및 동물성 식습관 등 잘못된 생활습관으로 고지혈증 및 당뇨 등이 발생하고 **세계적인 비용 부담은 1조 달러에 육박**한다고 알려짐.

♥또한, WHO의 'the top 10 causes of death' 보고서에 따르면, **2011년 사망원인 중 1위가 심혈관계 질환**이며, 이는 10명 중 3명이 심혈관계 질환으로 사망하는 것을 의미함.

♥미국심장학회에 따르면 미국의 고콜레스테롤혈증 유병률은 16% 정도이며, 이 수치는 우리나라보다 약 4-5%가 높은 정도임.

♥2005년 전 세계의 모든 연령대에서 사망한 5천백만 명 중 **심혈관계 질환(30%), 암(13%), 만성 호흡기질환(7%), 당뇨(2%), 기타 만성질환(9%)**으로 사망한 사람의 비율이 61%로 만성질환이 사망 원인의 절반이상을 차지함. 만성질환으로 인한 사망자 수는 지속적으로 증가하는 추세인데, 2020년경에는 만성질환으로 인한 사망자수가 5천만 명에 이를 것으로 전망하고 있음.

♥2005년 세계 질병부담 주요원인 중 **심혈관계 질환(10%), 암(5%), 만성 호흡기질환(4%), 당뇨(1%), 기타 만성질환(28%)**이 총 질병부담(DALYs) 중 48%를 차지하고, 2005년 한해 만성질환으로 발생한 질병부담은 총 725 DALYs로 남성이 372 DALYs, 여성이 354

DALYs이며 10만 명당 질병부담은 총 11,263 DALYs, 남성이 11,470 DALYs, 여성은 11,053 DALYs로 나타남.

종합적으로 보면, 만성질환의 주요 위험요인은 부적절한 식이, 신체 활동 저하, 흡연 등으로 혈압과 혈당을 올리며, 혈중 지질구성을 비정상적으로 변화시켜 과체중 또는 비만을 유발하여 만성질환을 유발하는 것으로 알려짐. 만성질환 중 심혈관계질환에 의한 사망률은 지속적으로 증가하고, 질병부담과 비용부담은 단연 선두에 있어서 이에 대한 대책이 시급하다고 봄.

## 2. 국내·외 심혈관계 질환 건강기능성 식품 현황

### 1) 국내 심혈관계 질환 건강기능성 식품 현황

♣ 한국보건산업진흥원이 발표한 ‘2014년 식품산업보고서’에 따르면 2013년 건강기능식품의 시장규모는 2009년 1조 1600억 원 대비 54.5% 급증한 1조 7920억 원으로 추정되며, 통계에 잡히지 않는 각종 식품군까지 포함할 경우 시장 규모는 이보다 2배 웃돌 것으로 전망하고 있음.

♣ 농업기술실용화재단에서는 건강기능식품 시장은 2008년부터 현재까지 꾸준히 증가하고 있으며, 그 중 개별인정형 제품은 51.04%의 성장률을 보이며 높은 성장세를 기록하고 있음.

♣ 한 통계조사에 따르면 우리나라 사람 10명 중 5명은 건강기능식품을 섭취한 경험이 있다고 할 정도로 건강기능식품은 건강관리를 위한 필수품의 하나로 자리 잡고 있음.

건강기능식품이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품으로 치료를 목적으로 하는 의약품과는 구별됨.

♣ LG경제연구원에서는 2012년, ‘선진국형 고성장 시장, 건강기능식품’ 보고서를 통해 앞으로의 건강기능식품은 체중조절용 시장과 더불어 콜레스테롤, 혈압 및 혈당과 관련한 혈관, 정신건강 제품 영역 등이 새롭게 부각될 것이라고 전망하고 있음.

### <건강기능식품 구매 시 고려하는 건강 관련 문제>

(단위 : %)

구 분	2010년	2012년	구 분	2010년	2012년
피로회복	46.5	56.3	골 건강	0.0	3.8
면역력 증진	41.7	43.1	배변활동	0.0	3.6
전반적 건강증진	24.7	24.9	혈압	3.3	2.9
혈행 개선	14.2	22.8	스트레스	0.0	2.4
영양보충	19.6	17.5	기억력	2.0	2.2
관절 건강	16.3	16.5	혈당	0.2	1.7
피부 건강	7.3	7.9	지구력 증진	0.0	1.5
눈 건강	5.3	7.5	당뇨병	0.7	1.4
콜레스테롤 개선	6.5	6.5	성장	0.0	1.0
노화방지	5.3	5.8	전립선 건강	1.1	0.9
체질 개선	6.9	5.3	숙면	0.0	0.5
장 건강	4.0	5.1	알레르기	0.5	0.3
체지방 감소	1.5	4.8	구강 건강	0.0	0.2
간 건강	5.6	4.1	기타	1.3	2.2

출처 : BFN(2013), "2013년 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사"

♣ 2013년 BFN의 건강기능식품 소비자 실태 및 시장구조 조사에 따르면 콜레스테롤개선을 목적으로 하는 건강기능식품 고려율이 6.5%로 2010년부터 2012년까지 동일한 비율로 중요성이 인식되고 있으며, 혈행개선의 경우 14.2%에서 22.8%로 증가함으로써 건강기능식품을 구매하고자 하는 소비자의 구매 목적이 심혈관계질환과 관련된 것으로 나타남.

♣ 2013년 식약처의 건강기능식품의 기능성원료로 인정 현황에 따르면 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 주는 원료로서 스피루리나를 포함한 대나무잎 추출물, 보리 베타글루칸 추출물, 알로에 추출물 등 12종이 개발되었으며, 혈행개선에 도움을 주는 은행잎추출물 등 7종이 개발됨.

따라서 뛰어난 효능의 새로운 원료 개발을 통한 신기능성 원료의 발굴이 큰 의미가 있음.

❖ **스피루리나**는 콜레스테롤 개선을 위한 식약청에서 등록된 고시형원료로서 ‘바다의 산삼’이라고 불리며, 염도가 높은 호수에서 자생함. 이것은 단백질과 비타민을 포함한 다양하고 풍부한 영양소를 함유하고 있으며, 인체 내 영양소 흡수율은 95%로 매우 높은 흡수율을 가지고 있음.

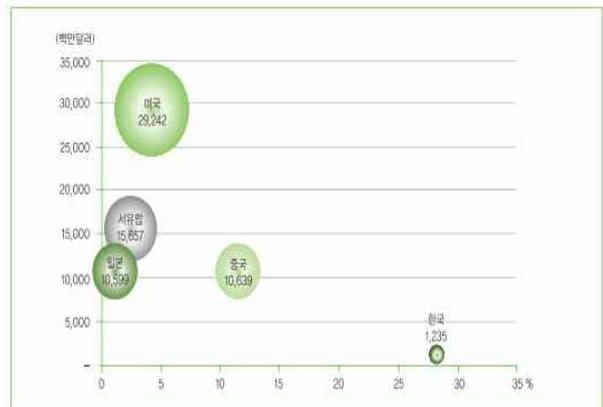


❖ 국내 업체인 대상웰라이프에서는 최근 면역증진, 체질개선과 더불어 결정적으로 콜레스테롤 개선에 도움을 주는 **해초록**이라는 건강기능식품을 개발하였으며, 주요 성분으로는 키토올리고당으로 갑각류(개, 새우)를 효소처리하여 키토산의 체내흡수율을 보다 높여 만든 복합기능성식품임.

## 2) 국외 심혈관계 질환 건강기능성 식품 현황

❖ Nutrition Business Journal estimates에 따르면 2011년 세계 건강기능식품 시장규모는 89십억 달러이며, 향후 2016년에는 120십억 달러를 상회할 것으로 예상됨.

❖ 국가/지역별 2011년 매출액을 살펴보면 미국이 29,242백만 달러로 가장 높으며, 2위는 서유럽이 15,657백만 달러로 나타남. 아시아 시장을 살펴보면 중국이 10,639백만 달러로 가장 큰 시장을 나타내고 있으며, 전년대비(2010년, 9,540백만 달러) 성장률은 11.5%로 급속한 성장세를 나타내고 있음. 2011년 기준 국내건강기능식품 시장은 세계 시장에서 1.4%의 비중을 차지함으로써 건강기능성 식품의 R&D 분야 성장 및 인식도 증가가 필요한 실정임.



[그림 5] 국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률(2011)

❖ 한 보고서에 따르면 세계건강기능식품 시장규모는 2012년 970억 달러에서 2015년에는 1천 180억 달러까지 늘어날 전망이며, 특히 중국을 필두로 한 아시아 신흥시장에서의 수요 증가가 시장규모 확대에 긍정적으로 작용하고 있음.

❖ 아티초크는 국내에서는 생소한 채소지만 영국, 독일, 스위스 등에서 소화불량 개선용 기능식품으로 인기가 있는데, 최근에는 혈중 콜레스테롤 수치를 떨어뜨리는데 도움이 된다는 연구결과가 발표되고 있음. 아티초크에는 각종 플라보노이드의 강력한 항산화 성분이 풍부해 콜레스테롤 수치를 낮추는 데 도움을 주며, 현재 국내에 판매중인 건강기능식품은 없으나 식품으로는 구할 수 있는 것으로 알려짐.



❖ 폴리코사놀은 사탕수수의 줄기와 잎에서 추출한 8가지 알코올 성분을 밀랍형태로 만들어 놓은 것인데, 콜레스테롤 조절과 고혈압, 고지혈증 등의 혈관 질환 치료 목적으로 개발되었으나 원료가 워낙 고가이기 때문에 효능은 치료제만큼이나 뛰어나지만 경제적인 난점이 따름.

### 3) 우리나라 건강기능성식품의 전망



♣효능은 뛰어나지만 고가 원료의 경제적 난점을 보완하여 보급성을 높이기 위한 방안으로 우리나라 농촌진흥청에서 개발한 재료인 쌀귀리가 2012년 최근에 부각되고 있음. 귀리는 미국 타임지의 10대 건강식품에 포함되어 있으며, 베타글루칸이 4.4%이상 함유되어 대장에서 콜레스테롤의 전구체를 배출해 혈중 콜레스테롤을 낮추는 역할을 함. 이로서 미국 FDA에서는 심장병인 관상동맥질환에 예방 효과가 있다는 표시를 허락함.

♣콜레스테롤 조절로 인한 혈관 질환의 예방을 위한 건강기능성 식품은 우리나라에서 재배 가능한 작물들이 개발되어 국내뿐 아니라 해외로까지 수출함으로써 세계적으로 각광받고 있는 추세임.

따라서 우리나라의 작물들이 식약청에서 인정하는 건강기능식품의 소재로 등록 가능하도록 연구·개발을 장려 및 촉진하고, 상품화하여 국내·외에서 인정하는 식품 소재의 개발을 통해 작물의 소재 활용성을 극대화할 필요성이 있음.

### 3. 차즈기 연구개발 대한 배경

♣차즈기 <Perilla frutescens(L.) Britton var. acuta Kudo>는 깻잎과 형태가 유사하며 잎의 한쪽 면이나 양면 모두가 자색을 띄므로 자소엽이라 불리기도 함.



♣한약재로 한방에서는 천식, 기침, 가래, 인후염, 소화불량, 요통, 불면증, 당뇨병 등의 처방에 이용되고 있고, 일본에서는 매실 장아찌(우메보시)를 염색하는 재료로 잘 알려져 있음. 잎은 생선의 중독을 막아주는 작용이 있으며, 들깻잎과 같은 용도로 사용하며, 잎 말린 것은 차 대용으로 사용, 장아찌를 만들어서 이용하기도 함.

♣깻잎의 형태와 비슷하게 씹의 재료로 사용 가능할 것으로 추측하여 차즈기의 콜레스테롤 개선 및 죽상동맥경화증 예방에 대한 효능을 바탕으로, 육류섭취로 인해 높아진 혈중 콜레스테롤 수치를 저하시킬 수 있는 흡수 개선의 기능성식품으로서 인정될 수 있을 것이라고 사료됨.

(식용 가능: 식약청 식품원재료 검색 활용 [http://fse.foodnara.go.kr/origin/search\\_ok.jsp](http://fse.foodnara.go.kr/origin/search_ok.jsp))

♣차즈기는 중국이 원산지이나, 우리나라에서도 전 지역에 걸쳐 자생하며 농지가 아니더라도 흔히 인가의 주변에서도 쉽게 자라 재배가 어렵지 않음. 차즈기는 약초의 재배 목적으로 이미 우리나라의 경상남도 산청, 강원도 봉평 등지에서도 재배가 이뤄지고 있어 구함이 용이하며, 원산지인 중국이 아닌 국내에서도 재배조건은 충분히 갖춰져 있다고 사료됨.

\* 차즈기의 화학성분에 관한 연구를 살펴보면 수면 연장의 작용이 있는 것으로 알려진 perillaldehyde가 정유 성분의 50%이상을 차지하며, essential oil, flavonoides, rosmarinic acid, stigmasterol, monoterphene glycoside, cyanogenic glycoside, diglucanoflavone 등이 함유되어 있다고 보고됨.

\* 차즈기의 기능성 성분을 분리하는 연구가 활발히 진행되고 있으나 이번 연구개발 목적으로 하는 콜레스테롤 대사와 관련한 차즈기 유효 성분 및 효능 평가에 대한 연구는 전무한 실정임. 이에 유효 성분의 추출에 적절한 용매의 선별과 기능성 확인 및 활성 측정 등에 관한 연구가 절대적으로 필요함.

식물명	차즈기
유사명	
학명	Perilla frutescens L. Britton var. acuta (Thunb.) Kudo
latin명	Perilla Herba
설명	중국 원산으로, 우리나라 각처의 밭에서 재배하는 1년초. 키 20-80cm. 전체가 자줏빛, 향기가 있으며, 줄기는 네모지고, 곧게서며, 가지를 침. 잎은 자줏빛이 돌며, 대생, 잎자루가 길고, 넓은 난형, 가장자리에 톱니가 있으며, 양 면에 털이 있음. 꽃은 연한 자주색, 총상화서, 화관은 통모양, 입술모양. 하순 꽃잎은 크고, 화관과 꽃받침토에 털이 퍼져 남. 열매는 소견과, 개화기 8-9월, 결실기 10월.
생약명	소엽
성미	性は溫하고 味는 辛하다
함유성분	Perilla aldehyde, d-Limonene, α-Pinene, Cyanin, Adenin, Algirin.
효능/효과	發汗解表, 行氣寬中, 安胎, 發汗, 解熱, 鎮痛
채취시기	가을(8-9월)
국내주요산지	중남부지방(홍성, 함안)에서 고르게 생산한다.
재배방법	직파법, 육묘식법. 성질이 강하여 풍토를 가리지 않고 아무데 나 잘 되지만 따뜻한 기후에 더 잘되며 토질은 경업을 수확교자 할 때에는 비옥한 땅에 심는 것이 좋으나 종자를 수확교자 할 때에는 중질토에 심는 것이 좋으며 배수가 잘 되는 양토 또는 사질양토에서 가장 잘 되나 습기에 대하여 비교적 강한 약초이다.

\* 차즈기의 유효성분을 안정적으로 분리할 수 있도록 하는 최적의 추출조건을 확립하여 기능성 물질의 분리 정제를 통해 항동맥경화 활성을 가지는 물질을 탐색 및 효능 평가 연구의 진행으로 고부가가치의 식재료 개발 및 기대가치가 큰 작물로서 농가소득의 증대를 기대할 수 있음.

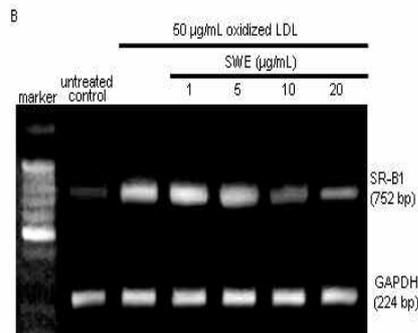
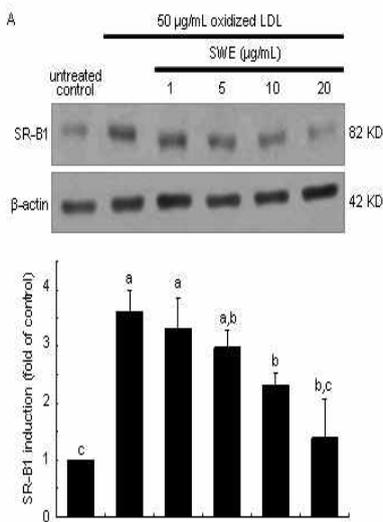
\* 차즈기로 경화성 혈관질환에 관해서는 연구가 전혀 이루어져 있지 않았고, 효능 또한 입증된 바가 없기 때문에, 본 연구개발을 통해 콜레스테롤과 관련한 동맥경화 억제활성을 가지는 식품 소재로서 활용 가치가 있음을 입증하고자 함.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 제1세부 : 고콜레스테롤혈증으로 인한 경화성 혈관질환 개선을 위한 차즈기 소재 개발

1) 선행연구에서 차즈기라는 물질을 선별하기 이전, 이와 유사한 물질인 배암차즈기의 효능 평가를 실시하였다. 1차년도에서는 이에 대한 연구 수행을 계속하였다. 다음의 Fig. 1-6에서는 배암차즈기의 콜레스테롤 유입 및 유출에 대한 효과와 유출된 콜레스테롤이 동맥경화증에서 예방 인자로 알려진 HDL로 전환되는 과정을 확인하였다

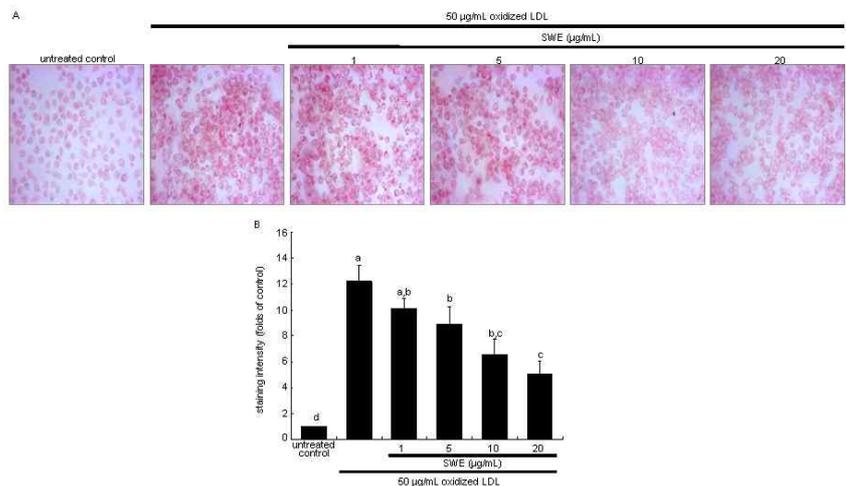
#### (1) 대식세포에서 배암차즈기 추출물 (SWE)의 산화 LDL 유입 억제 효능평가



**Fig. 1:** 대식세포에서 산화 LDL의 유입에 관련된 수용체인 SR-B1의 단백질 발현 (A)과 mRNA 수준 (B)을 확인한 결과, 배암차즈기 추출물 (SWE)을 1-20 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, SR-B1의 단백질 발현 및 mRNA 수준이 감소함으로써 배암차즈기 추출물이 대식세포에서 산화 LDL의 유입을 억제한다는 것을 확인하였다.

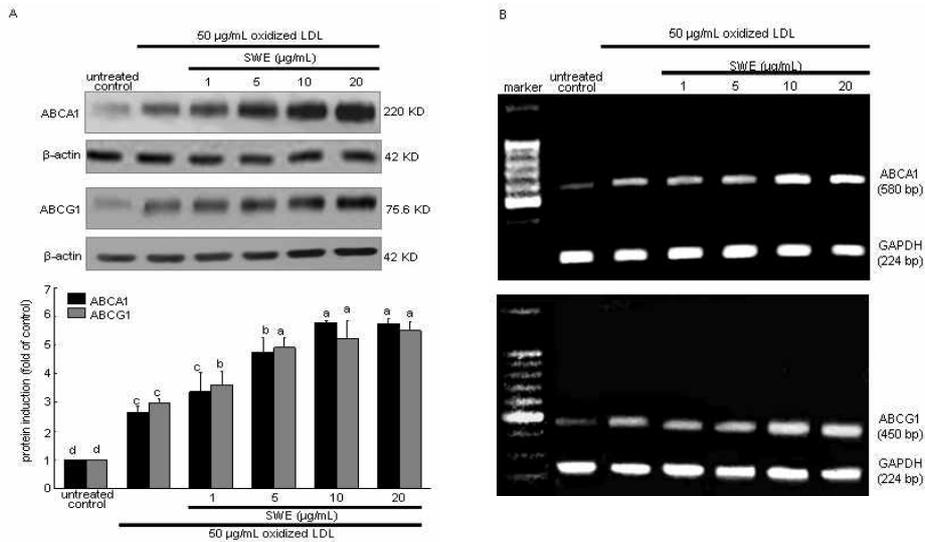
#### (2) 배암차즈기 추출물의 거품세포 형성 억제 효능평가

**Fig. 2:** 대식세포에 산화 LDL이 유입되면 세포 내 지질 축적을 유도하고, 이것을 거품세포라고 명명한다. 지질을 염색하는 Oil red O를 사용하여 세포 내 지질 축적의 정도를 확인하였다 (A). 배암차즈기 추출물을 1-20 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 염색된 부분들이 감소하는 것을 확인하였고, 염색된 세포들을 0.1



M NaOH로 녹여 490 nm 파장에서 흡광도를 확인한 결과 (B), 배암차즈기 추출물을 1-20 µg/mL 농도로 처리하였을 때 흡광도 값이 감소하는 것을 확인하였다. 즉, 배암차즈기 추출물은 대식세포에서 산화 LDL로 유도된 거품세포의 형성을 감소시킨다는 것을 확인하였다.

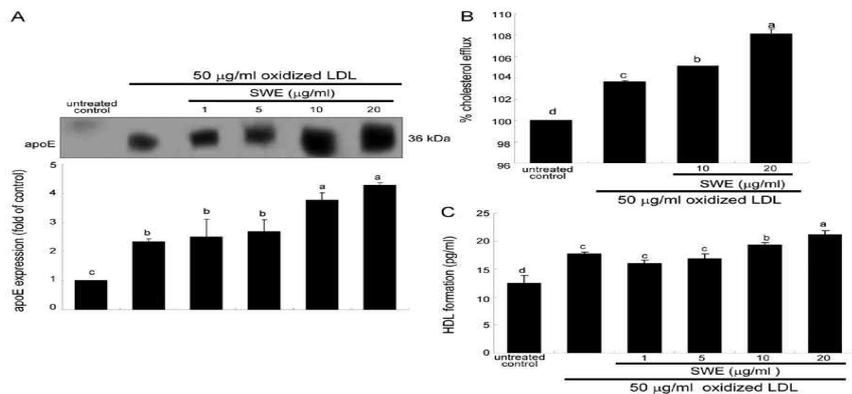
(3) 거품세포에서 배암차즈기 추출물의 콜레스테롤 유출 촉진에 대한 바이오마커 효능평가



**Fig. 3:** 거품세포에서 세포 내 축적된 콜레스테롤을 세포 외로 유출하는 콜레스테롤 유출에 관련된 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현을 확인하였다 (A). 배암차즈기 추출물을 1-20 µg/mL 농도로 처리하였을 때, ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 ABCA1과 ABCG1의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인해 본 결과 (B), 단백질 발현의 결과와 동일하게 배암차즈기 추출물을 1-20 µg/mL 농도로 처리하였을 때 mRNA의 수준이 증가하는 것을 확인하였다. 즉, 배암차즈기 추출물은 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현과 mRNA 수준을 증가시키면서 거품세포에서 콜레스테롤의 유출을 유도하는 것을 확인하였다.

(4) 배암차즈기 추출물의 콜레스테롤 유출 촉진 및 HDL 형성에 대한 효능평가

**Fig. 4:** 대식세포에서 apoE의 분비는 거품세포의 형성을 억제하고, 콜레스테롤 유출을 촉진하는 것으로서 동맥경화증의 예방에 있어서 중요한 바이오마커다. 대식세포에서 apoE의 분비를 단백질 발현으로 확인하였을 때

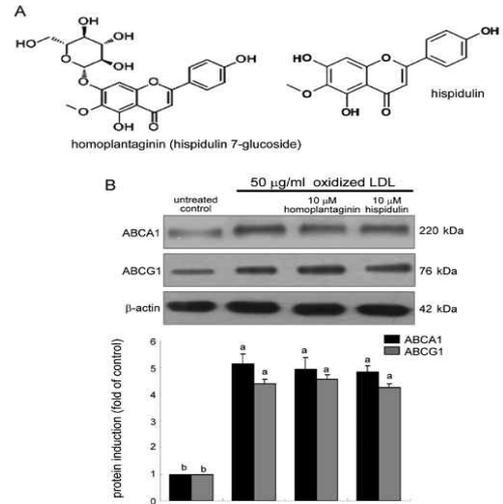


(A), 배암차즈기 추출물 10 µg/mL 이상의 농도에서 apoE의 분비가 증가하였다. 또한 NBD-콜레스테롤을 사용한 콜레스테롤 유출 분석법으로 콜레스테롤 유출을 확인해 본 결과 (B), 배암차즈기 추출물 10 µg/mL 이상의 농도에서 농도의존적으로 콜레스테롤의 유출이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 유출된 콜레스테롤이 분비된 apoE에 의해 HDL로 전환되어 동맥경화를 완화시킨다는 연구 결과를 토대로 HDL의 형성 정도를 ELISA를 이용해 확인해 본 결과 (C), 배암차즈기 추출물 10 µg/mL 이상의 농도에서 HDL의 형성이 농도의존적으로 증가된 것을 확인하였다. 따라서 배암차즈기 추출물은 콜레스테롤의 유출과 apoE의 분비를

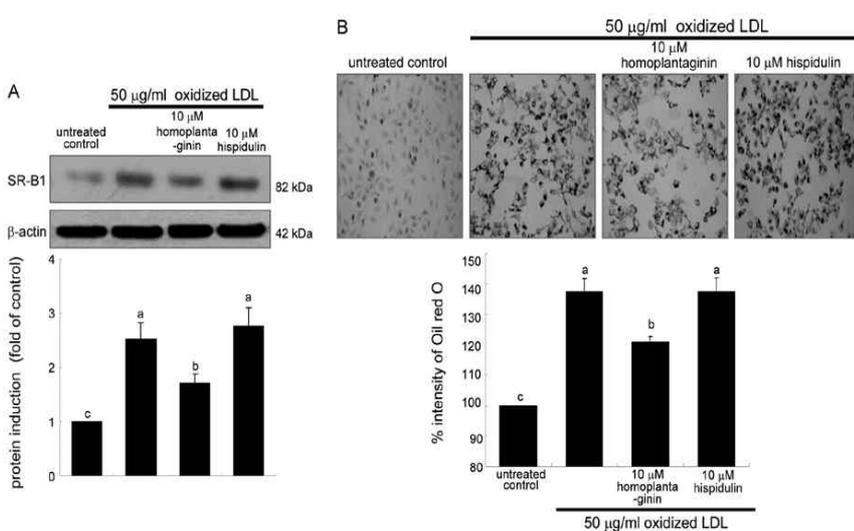
촉진함으로써 HDL의 형성을 증가시켜 동맥경화증을 완화할 수 있음을 확인하였다.

(5) 배암차즈기 추출물 함유 유효 성분의 콜레스테롤 유출에 대한 바이오마커 효능평가

**Fig. 5:** 배암차즈기 추출물에 함유된 대표적인 단일 유효 성분인 homoplantagin과 hispidulin (A)을 처리하여 콜레스테롤 유출에 관련된 대표적인 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현을 확인하였다 (B). 실험 결과, 10  $\mu$ M homoplantagin과 hispidulin 모두 ABCA1과 ABCG1에 어떠한 영향도 주지 않는다는 것을 확인하였다. 이로써 배암차즈기 추출물에 함유한 단일 유효 성분은 콜레스테롤 유출에는 영향을 주지 않는다는 것을 확인하였다.



(6) 배암차즈기 추출물 함유 유효 성분의 산화 LDL 유입 억제 효능평가

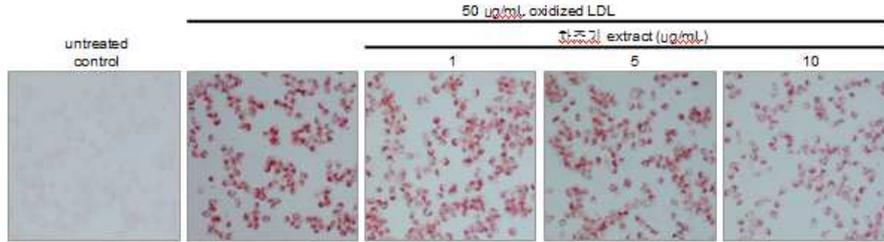


**Fig. 6:** 배암차즈기 추출물에 함유된 대표적인 단일 유효 성분인 homoplantagin과 hispidulin이 대식세포에서 산화 LDL의 유입에 영향을 미치는지 관련 수용체인 SR-B1의 단백질 발현을 통해 확인하였다 (A). 10  $\mu$ M homoplantagin에서만 SR-B1의 단백질 발현이 감소하였고, 산화 LDL로 유도된 거품세포의 형성을 Oil

red O 염색법으로 확인했을 때 (B), 10  $\mu$ M homoplantagin에서만 Oil red O 염색 정도가 감소되는 것을 확인하였다. 그러므로 배암차즈기 추출물에 함유된 대표적인 단일 유효 성분인 homoplantagin이 산화 LDL의 유입 및 이로 인해 형성되는 거품세포의 형성을 억제한다는 것을 확인하였다.

2) 아래 Fig. 7-9는 중국산 차즈기의 MeOH 추출물에서 hexane 분획물의 효능을 거품세포의 형성 및 콜레스테롤 유출 정도를 통해 효능을 평가하였다.

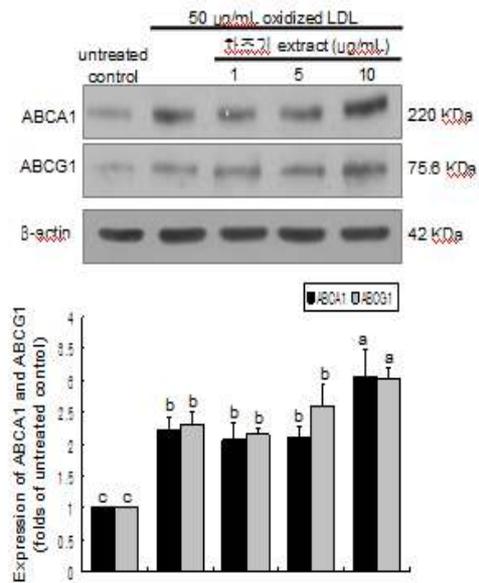
(7) 차즈기 추출물의 거품세포 형성 억제 효능평가



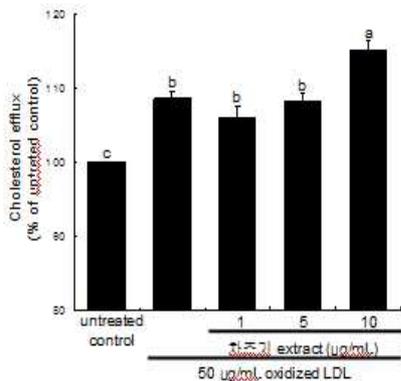
**Fig. 7:** 차즈기 추출물이 산화 LDL의 유입으로 인한 거품세포의 형성에 영향을 미치는지 거품세포의 내부에 침착된 지질성분을 염색할 수 있는 Oil red O 염색법을 통해 확인하였다. 10 µg/mL 차즈기 추출물에서 Oil red O 염색 정도가 감소되는 것을 확인하였고, 이로써 차즈기 추출물은 산화 LDL로 유도된 거품세포의 형성을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

(8) 거품세포에서 차즈기 추출물의 콜레스테롤 유출과 관련된 바이오마커 효능 평가

**Fig. 8:** 콜레스테롤이 축적된 거품세포에서 차즈기 추출물이 콜레스테롤의 세포 외 유출에 관련된 대표적인 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1에 영향을 미치는지 단백질 발현을 통해 확인하였다. ABCA1과 ABCG1은 10 µg/mL 차즈기 추출물의 농도에서 산화 LDL을 처리한 군보다 단백질 발현이 더 증가된 것을 확인하였다. 그러므로 10 µg/mL 차즈기 추출물은 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현을 증가시킴으로써 축적된 콜레스테롤을 세포 밖으로 유출하는 것을 촉진하였다.



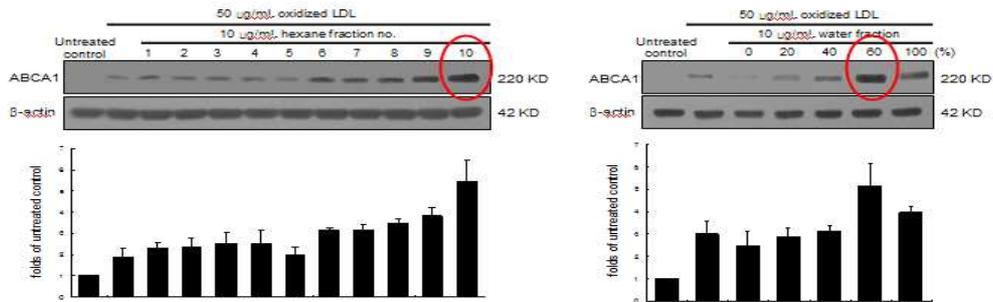
(9) 차즈기 추출물의 콜레스테롤 유출 촉진 효과



**Fig. 9:** 차즈기 추출물이 실제로 콜레스테롤을 세포 외로 유출하는지 알아보기 위해 Fig 8.에서 언급했던 콜레스테롤 유출에 관련된 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현뿐만 아니라 콜레스테롤 유출법을 통해 유출을 비율로 측정하였다. 10 µg/mL 차즈기 추출물 농도에서 콜레스테롤 유출은 정상군보다 14 % 증가하였고, 대조군인 산화 LDL을 처리한 군보다 약 7 % 정도 (약 2배) 더 증가한 것을 확인하였다. 그러므로 10 µg/mL 차즈기 추출물이 실제로 세포에 축적된 콜레스테롤을 세포 밖으로 유출함으로써 콜레스테롤 유출을 촉진하는데 관련 있다.

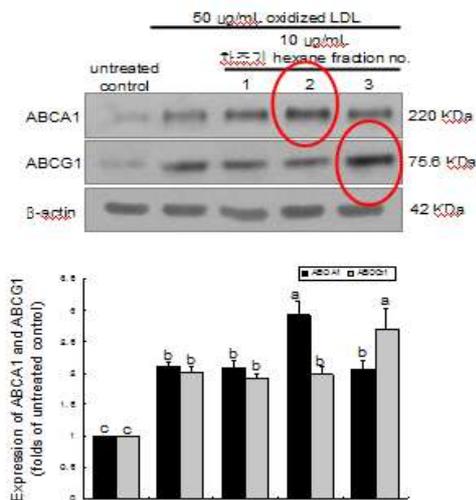
3) 아래 Fig. 10-12에서는 제1협동과제에서 분리한 추출물의 세부 분획물별 효능을 콜레스테롤의 유출에 관여하는 대표적인 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현 등을 통해 확인한 결과이다.

(10) 차즈기 추출물의 유효 성분 지표 탐색을 위한 다양한 fractions의 효능 평가



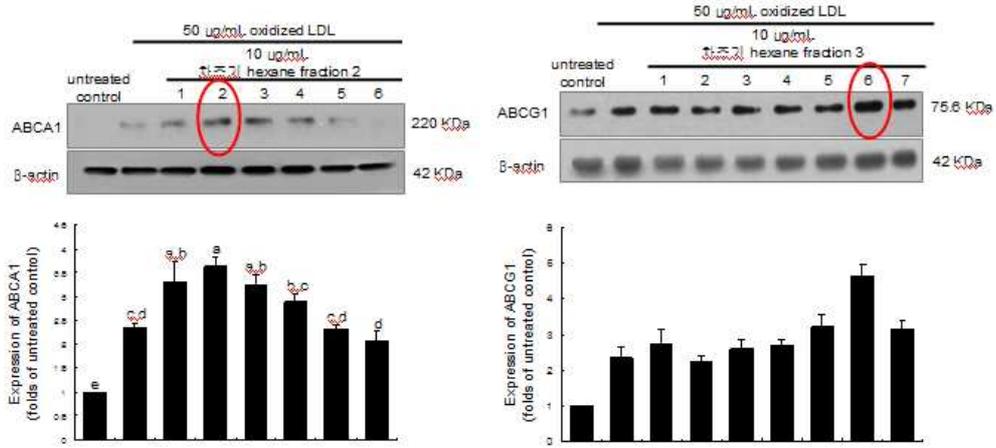
**Fig. 10:** 차즈기 추출물의 유효성분 탐색 및 분리를 위한 다양한 분획물들의 효능을 콜레스테롤 유출에 대표적인 바이오마커인 ABCA1의 단백질 발현을 통해 확인하였다. hexane 분획물의 여러 가지 중량별 분획물들을 대식세포에 처리하였을 때, 10번 처리군에서 ABCA1의 단백질 발현이 증가된 것을 확인하였다. 그리고 H<sub>2</sub>O의 중량별 분획물들을 대식세포에 처리하였을 때, 60%의 물 fraction 처리군에서 ABCA1의 단백질 발현이 증가한 것을 확인하였다. 그러므로 hexane 분획물 중 10번과 H<sub>2</sub>O 분획물 중 60%가 ABCA1의 단백질 발현을 증가시킴으로써 콜레스테롤 유출을 촉진하였다.

(11) 차즈기 추출물의 hexan fraction의 세분화에 따른 ABCA1과 ABCG1 바이오마커의 효능 평가-1



**Fig. 11:** 차즈기 추출물의 hexane 분획물 10번에서 ABCA1의 효능이 있었다 (Fig. 10). 이 분획물에서 단일 유효 성분을 탐색하기 위해 해당 분획물을 더 세분화하여 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현을 통해 효능평가를 수행하였다. ABCA1의 경우, 해당 분획물 중 2번 처리군에서 단백질 발현이 증가한 것을 확인하였고, 반면 ABCG1의 경우, 해당 분획물 중 3번 처리군에서 단백질 발현이 증가한 것을 확인하였다. 이로써 효과가 있었던 hexane 분획물 10번 중, ABCA1은 2번과 ABCG1은 3번에 각각 효과를 보이는 것으로 확인하였다.

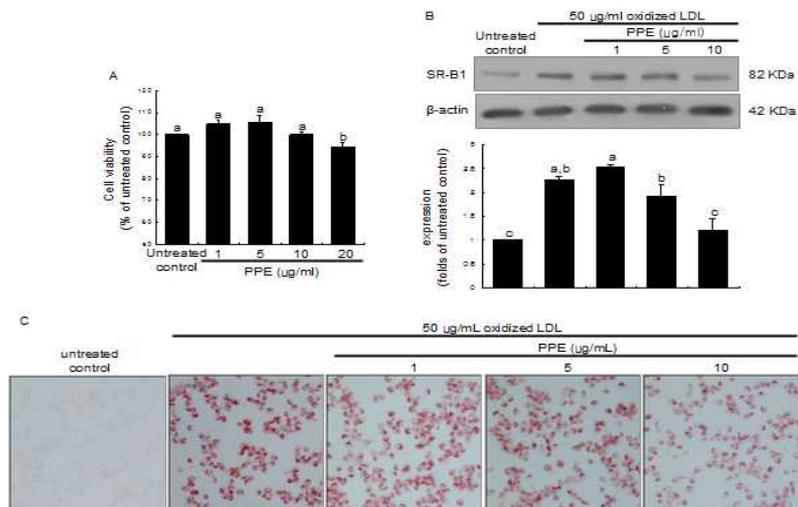
(12) 차즈기 추출물의 hexan fraction의 세분화에 따른 ABCA1과 ABCG1 바이오마커의 효능 평가-2



**Fig. 12:** Fig. 11에서는 차즈기 추출물의 hexane 분획물 중, ABCA1과 ABCG1에 각기 다른 분획물들이 효과가 있는 것을 단백질 발현을 통해 확인하였다. 이러한 효과가 있었던 두 가지 분획물들을 더 세분화하여 콜레스테롤 유출의 효능평가에 이용했던 바이오마커들을 통해 단백질 발현으로 확인하였다. 우선 ABCA1의 경우, 2번 처리군에서 단백질 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었고, ABCG1의 경우, 6번 처리군에서 단백질 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 즉, ABCA1과 ABCG1에는 각기 다른 분획물들이 효능을 가지는 것을 확인하였다.

4) 아래 Fig. 13-16는 중국산 차즈기의 MeOH 추출물에서 hexane 분획물의 효능을 거품세포의 형성 및 콜레스테롤 유출 정도와 콜레스테롤 유출에 관련된 transcription factor와의 연관성을 통해 효능 평가하였다.

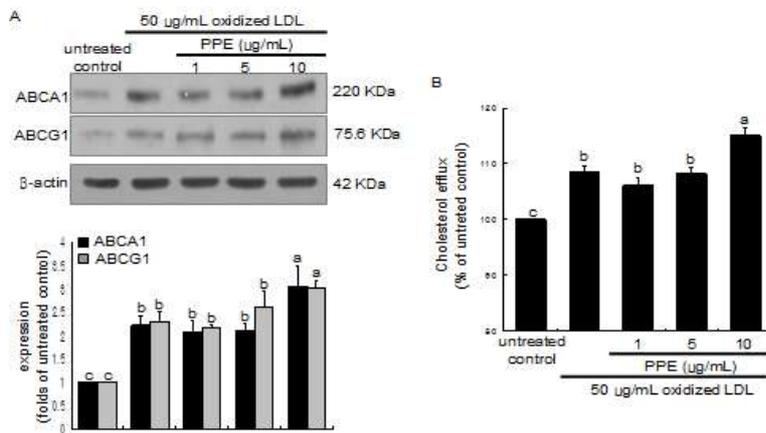
(13) 차즈기 추출물의 세포 내 콜레스테롤 유입 억제 효능 평가



**Fig. 13:** 산화 LDL은 Scavenger Receptor class B-1 (SR-B1) 수용체를 통해 세포내로 유입되어 세포 내 지질이 축적된 형태인 거품세포를 형성하며, 죽상동맥경화증으로의 이행을

축진한다. (A)에서는 J774A.1 대식세포에서 차즈기 추출물의 농도에 따른 독성평가를 MTT assay를 통해 실시한 것이며, 1-10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포독성이 없는 것을 확인하였다. 차즈기 추출물의 독성이 없는 농도에서 SR-B1의 단백질발현 (B) 및 세포내 지질이 축적된 형태를 확인하기 위한 Oil red O 염색 (C)을 통해 효능을 확인하였다. 산화 LDL을 처리한 그룹에서는 SR-B1의 단백질 발현이 증가하였고, 이로 인해 지질이 축적된 부분에 염색이 많이 일어난 것을 확인하였다. 또한 차즈기 추출물을 1-10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 그룹에서는 5  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 SR-B1의 단백질 발현이 감소하고, 지질이 축적된 부분에서 염색이 감소되는 것을 확인하였다. 따라서 차즈기 추출물은 5  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 세포 내 산화 LDL의 유입을 감소시키며, 이로 인한 세포 내 지질축적을 감소시킨다.

#### (14) 차즈기 추출물의 콜레스테롤 유출능 축진 효능 평가

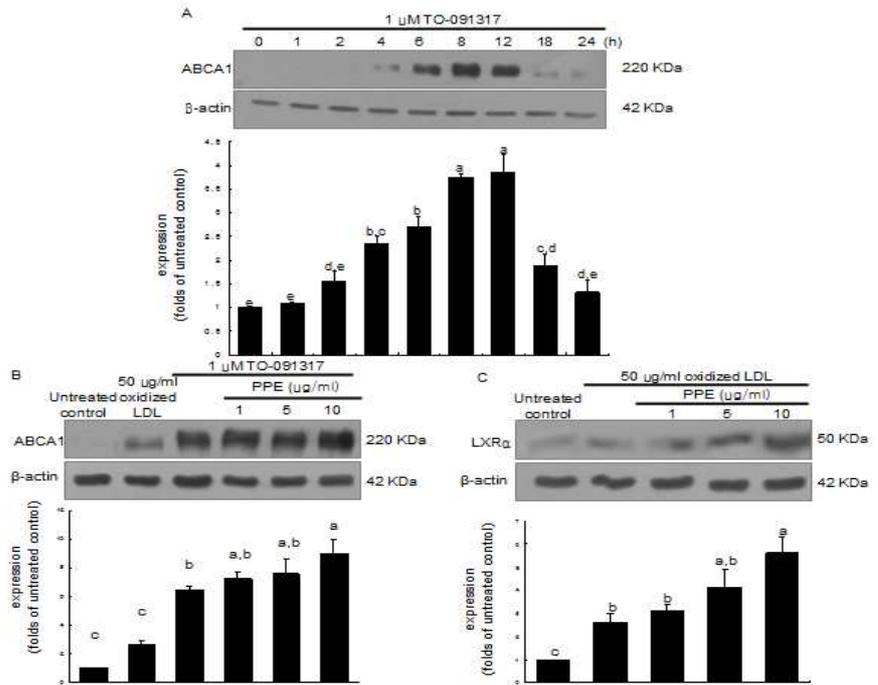


**Fig. 14:** 세포 내 축적된 지질 성분 중, 콜레스테롤의 세포외유출은 축적된 콜레스테롤을 감소시키며, 이것은 죽상동맥경화증의 완화에 있어 중요한 기전이다. 콜레스테롤의 유출에 관련된 다양한 바이오마커들 중, ATP-binding cassette transporter A-1 (ABCA1)과 ATP-binding cassette transporter G-1 (ABCG1)이

대표적으로 알려져 있고, 이번 실험에서는 이 마커들의 단백질 발현을 확인하였다 (A). 산화 LDL을 처리한 그룹에서 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현이 control 그룹에 비해 증가하였고, 차즈기 추출물을 처리한 그룹에서는 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 두 단백질 모두의 발현을 촉진하는 것을 확인하였다. 또한 실제로 세포내 콜레스테롤이 세포 밖으로 유출되었는지 확인할 수 있는 NBD-cholesterol을 이용한 cholesterol efflux assay를 통해 확인하였다 (B). 그 결과, 차즈기 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서만 콜레스테롤의 유출을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 차즈기 추출물은 콜레스테롤의 유출을 증가시키는 효능을 가진다.

(15) 차즈기 추출물의 세포내 콜레스테롤 유출 촉진 기전 연구-Liver X receptor  $\alpha$  연구

**Fig. 15:** 세포 내 축적된 콜레스테롤은 ABCA1을 통해 세포 밖으로 유출되고, 이것이 어떤 기전을 통해 연결되는지 확인하기 위해 transcription factor로 잘 알려진 Liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ )을 통해 확인하였다. LXR $\alpha$  agonist인 TO-091317을 처리하여, ABCA1의 단백질 발현을 확인하였을 때 (A), 12시간에 가장 많이 발현되었다. 또한, 산화 LDL을 처리한 그룹과

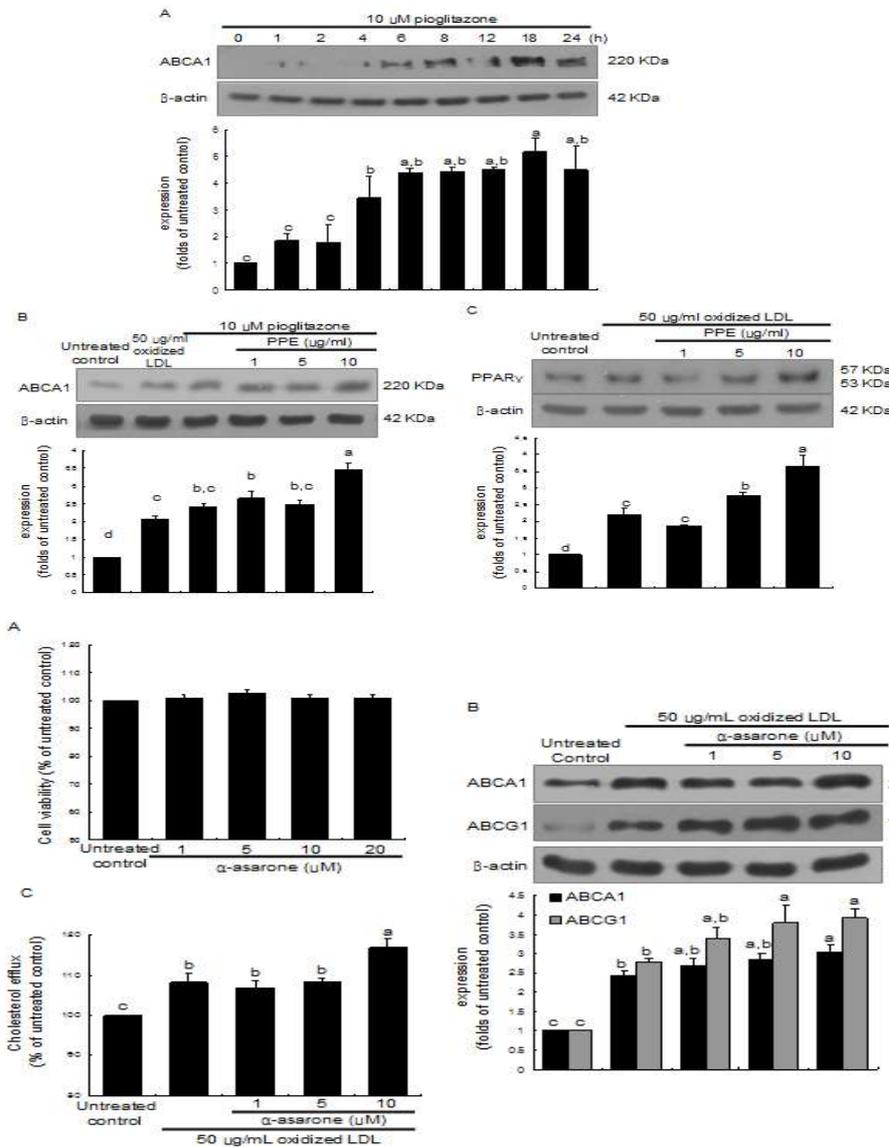


비교해보면 (B), ABCA1의 단백질 발현은 TO-091317을 처리하였을 때 더 많은 단백질이 발현하였고, 여기에 차즈기 추출물을 처리하면 10  $\mu$ g/ml의 농도에서 단백질 발현을 더 증가시켰다. 이것으로 보아 차즈기 추출물은 LXR $\alpha$ 를 통해 ABCA1의 단백질 발현을 촉진한다는 것을 알 수 있다. C에서는 실제로 산화 LDL을 통한 LXR $\alpha$ 의 단백질 발현에 차즈기 추출물이 효능을 가지는지 확인한 결과, 10  $\mu$ g/ml의 농도에서 LXR $\alpha$ 의 단백질 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 ABCA1은 LXR $\alpha$ 를 통한 기전으로 연결되며, 차즈기 추출물은 LXR $\alpha$ 를 증가시킴으로써 ABCA1의 발현을 촉진한다.

(16) 차즈기 추출물의 세포내 콜레스테롤 유출 촉진 기전 연구-

Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  연구

**Fig. 16:** 세포 내 축적된 콜레스테롤은 ABCA1을 통해 세포 밖으로 유출되고, 이것이 어떤 기전을 통해 연결되는지 확인하기 위해 지질대사에서 가장 잘 알려진 transcription factor인 Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )를 통해 확인하였다. PPAR $\gamma$  agonist인 pioglitazone을 처리하여 ABCA1의 단백질 발현을 확인한 결과 (A), 18시간에 가장 많이 발현하였다. 또한 산화 LDL만 처리한 그룹과 비교해보면 (B), pioglitazone을 처리한 그룹에서 ABCA1의 단백질 발현이 조금 증가된 것을 확인할 수 있고, 여기에 차즈기 추출물을 처리한 결과, 10  $\mu$ g/ml의 농도에서 ABCA1 단백질의 발현이 증가된 것을 확인하였다. 또한, 실제로 산화 LDL을 통한 PPAR $\gamma$ 의 단백질 발현에서 차즈기 추출물이 효능을 가지는지 확인한 결과 (C), 차즈기 추출물을 처리한 그룹에서 농도의존적으로 단백질 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있다. 따라서 차즈기 추출물은 PPAR $\gamma$ 를 통해 ABCA1의 단백질 발현을 촉진하는 것을 알 수 있다.



5) 아래 Fig. 17-18는 중국산 차즈기의 hexane 분획물에서 분리한 단일 유효성분인  $\alpha$ -asarone의 효능을 콜레스테롤 유출에 관련한 바이오마커인 ABCA1/G1을 통해 효능 평가하였다.

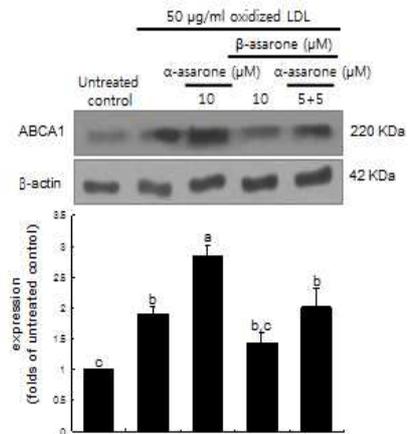
(17) 차즈기 추출물의 유효성분인  $\alpha$ -asarone의 콜레스테롤 유출 효능 평가

Fig. 17: 차즈기 hexan 추출물의 유효성분으로 밝혀진  $\alpha$ -asarone을 선정 및 세포 독성평가를 실시하였다 (A). 그 결과,  $\alpha$ -asarone은 높은 농도에서도 세포 독성을 보이지 않았다. 또한 세포

내 축적된 콜레스테롤의 유출을 확인하기 위해 관련 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현을 확인하였다 (B). 산화 LDL을 처리한 그룹에서 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현은 control보다 증가한 것을 확인하였고,  $\alpha$ -asarone을 처리한 그룹에서는 10  $\mu$ M의 농도에서 두 단백질의 발현이 모두 증가한 것을 확인하였다. 또한 실제로 콜레스테롤의 유출을 NBD-cholesterol을 이용한 cholesterol efflux assay를 통해 확인한 결과 (C), 산화 LDL을 처리한 그룹보다 10  $\mu$ M 농도의  $\alpha$ -asarone을 처리한 그룹에서 콜레스테롤의 유출이 더 촉진되는 것을 확인하였다. 따라서 차즈기 추출물의 유효성분으로 밝혀진  $\alpha$ -asarone은 세포 내 축적된 콜레스테롤의 유출을 증가시켜, 죽상동맥경화증의 예방 기전을 활성화시키는 것을 알 수 있다.

(18) asarone의 이성질체에 따른 ABCA1 효능 평가

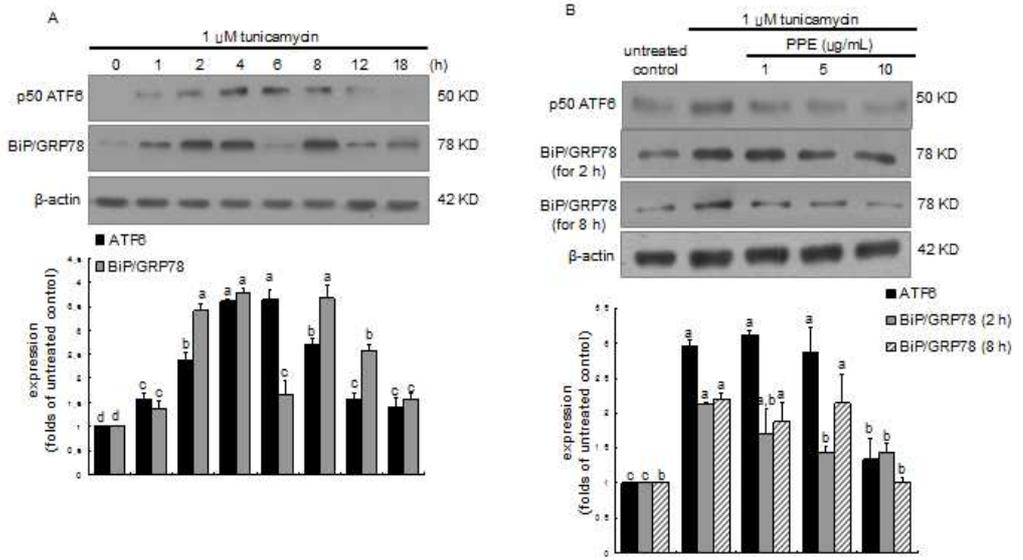
**Fig. 18:** asarone에는 두 가지 형태의 이성질체가 존재한다. 두 이성질체의 차이가 ABCA1의 단백질 발현에 다른 결과를 가지는지 확인하였다.  $\alpha$ -asarone과  $\beta$ -asarone을 각각 처리하고, 다른 한 그룹은 두 가지를 섞어서 처리한 결과,  $\alpha$ -asarone에서만 ABCA1 발현에 대한 효능이 있을 뿐,  $\beta$ -asarone에서는 어떠한 효능도 없었다. 또한 두 가지를 섞어서 처리한 그룹에서는  $\alpha$ -asarone만 처리한 그룹보다 현저히 낮은 효능을 보였다. 따라서 ABCA1에 효능을 가지는 asarone은  $\alpha$ -형태에서만 효능이 있는 것을 확인하였다.



6) 아래 Fig. 19-25는 중국산 차즈기의 MeOH 추출물에서 hexane 분획물의 효능을 소포체 스트레스[endoplasmic reticulum(ER) stress]를 통해 효능 평가하였다.

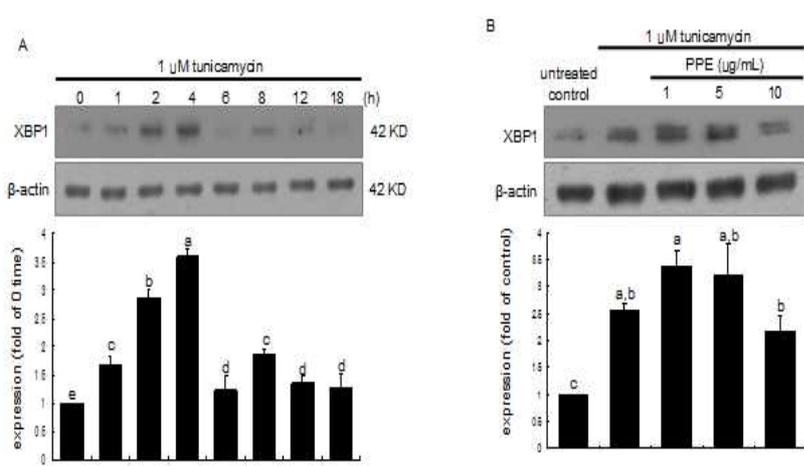
(19) 차즈기 추출물의 ER stress 억제 효능 평가

**Fig. 19:** 죽상동맥경화증 발달 단계의 다양한 원인 중, 최근 동향에 따라 세포 내 과도한 지질 축적으로 인한 ER stress의 발생이 이슈화되고 있다. 따라서 ER stress 유도제인



tunicamycin을 처리하여 ER stress를 유도하고, ER stress의 중요한 바이오마커 중 하나인 p50 ATF6와 chaperone으로 알려진 BiP/Grp78의 단백질 발현을 확인하였다. (A)에서는 tunicamycin을 시간대별로 처리하고, 두 단백질의 발현을 확인한 결과, p50 ATF6는 6시간에 가장 많이 발현되었고, BiP/Grp78은 4시간과 8시간에 가장 많이 발현되었다. 각 시간대별로 차즈기 추출물을 처리한 결과, 차즈기 추출물 10  $\mu$ g/ml 농도에서 두 단백질의 발현이 모두 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 차즈기 추출물은 ER stress를 억제하는 효능이 있다.

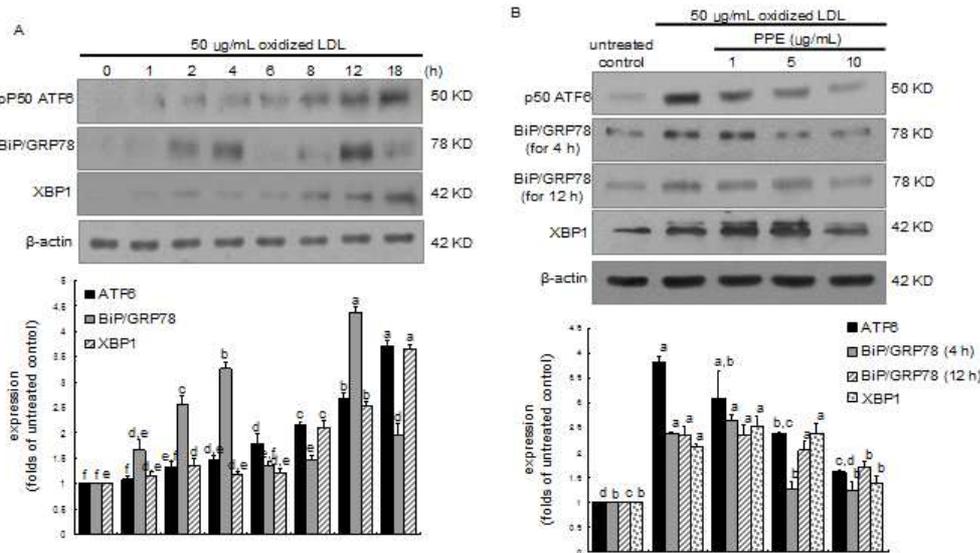
(20) 차즈기 추출물의 ER stress 억제 효능 평가-X-box Binding Protein 1에 대한 연구



**Fig. 20:** ER stress 유도제인 tunicamycin을 처리하여 X-box Binding Protein-1 (XBP1)의 단백질 발현을 시간대별로 확인한 결과, 4시간에 가장 많이 발현되었다. 이 시간대에 차즈기 추출물을 처리한 결과, 10 μg/ml의 농도에서 XBP1의 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 따라서

tunicamycin을 통해 직접적으로 유도한 ER stress에서 차즈기 추출물이 억제하는 것을 알 수 있다.

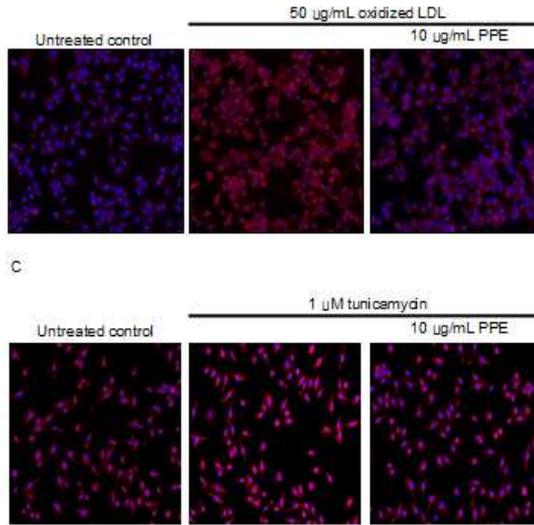
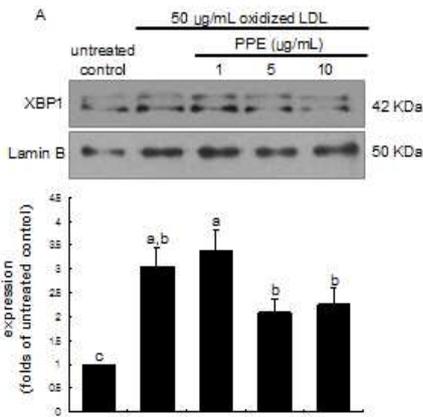
(21) 차즈기 추출물의 ER stress 억제 효능 평가-ATP6와 BiP/Grp78 연구



**Fig. 21:** 죽상동맥경화증의 대표적인 원인이 되는 요소로 산화 LDL이 있고, 이것을 세포에 처리하였을 때도 ER stress가 나타나는지 확인하였다. 대표적인 ER stress의 바이오마커인 p50 ATF6와 BiP/Grp78,

그리고 XBP1의 단백질 발현을 통해 확인한 결과 (A), 산화 LDL을 시간대별로 처리하면 p50 ATF6와 XBP1은 18시간, Bip/Grp78은 12시간에 가장 많이 발현되었다. 또한 각 시간대에 차즈기 추출물을 처리한 결과, 10 μg/ml의 농도에서 세가지 단백질이 모두 감소하였다. 따라서 차즈기 추출물은 산화 LDL로 유도한 ER stress를 감소시킴으로써 죽상동맥경화증을 예방할 수 있다.

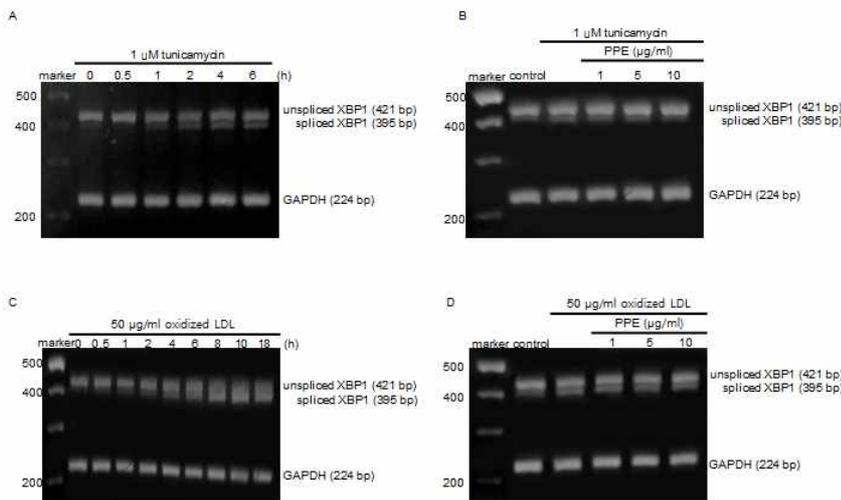
(22) 차즈기 추출물의 XBP1 translocation 억제 효능 평가



**Fig. 22:** ER stress로 활성화된 XBP1은 세포질에서 핵으로 이동한다. (A)에서는 산화 LDL을 처리하여 ER stress를 유도하고, XBP1의 핵으로의 이동을 확인하기 위해 세포질을 제외한 핵만 따로 분리해서

핵단백질을 확인한 결과이다. 이 결과, 차즈기 추출물 5-10 µg/ml의 농도에서 XBP1의 핵단백질의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 보다 정확하게 확인하기 위해 세포에 XBP1 antibody를 이용해 형광면역학적방법으로 확인한 결과, 산화 LDL과 tunicamycin으로 각각 ER stress를 유도한 그룹에서는 XBP1의 과발현과 동시에 핵으로의 이동까지 관찰할 수 있었고, 10 µg/ml의 차즈기 추출물을 처리한 그룹에서는 XBP1의 발현이 감소하며, 핵으로의 이동도 마찬가지로 감소되는 것을 확인하였다. 따라서 차즈기 추출물은 각각 산화 LDL과 tunicamycin으로 유도된 ER stress에서 XBP1을 조절하면서 억제하는 것을 알 수 있다.

(23) 차즈기 추출물의 XBP1 mRNA 수준 억제 효능 평가

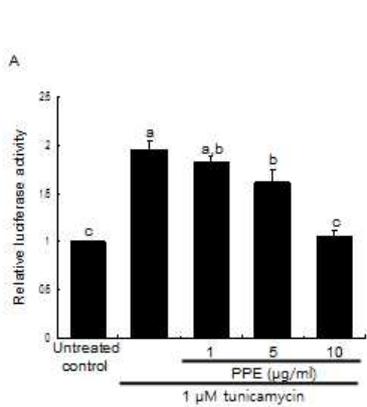


**Fig. 23:** ER stress로 인해 XBP1의 mRNA수준에서는 intron부분이 절단되는 현상이 나타나며, 절단된 XBP1 mRNA 수준이 ER stress를 심화시키는 것으로 알려져 있다. ER stress를 유도하기 위해 tunicamycin과 산화 LDL을 각각 처리하고, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR;

중합효소연쇄반응)을 통해 XBP1의 절단 전후의 mRNA 수준을 확인하였다. (A)와 (C)에서는 시간대별로 각각의 반응 유도제를 처리하였고, 가장 많이 절단된 시간으로 tunicamycin을 처리한 그룹에서는 4시간, 산화 LDL을 처리한 그룹에서는 10시간을 확인하였다. (B)와

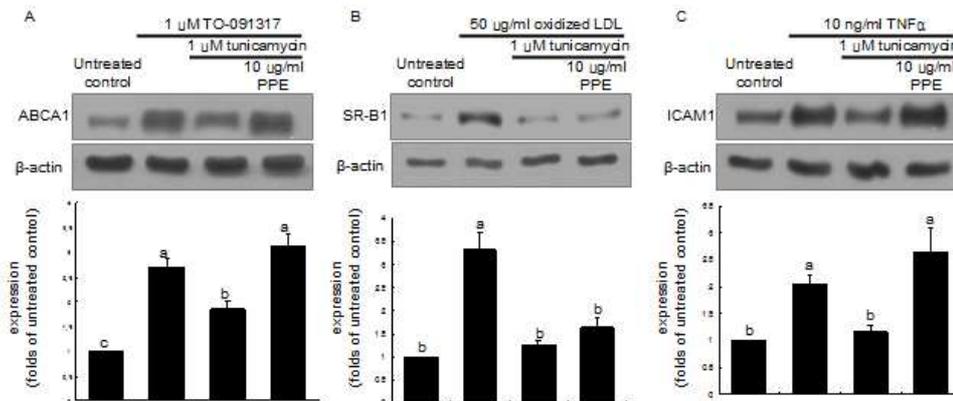
(D)에서는 각 시간대별로 차즈기 추출물을 처리하였을 때 효능을 확인하였고, 두 그룹 모두에서 10 µg/ml의 차즈기 추출물을 처리하였을 때, 절단된 XBP1의 mRNA 수준을 감소시키는 것을 확인하였다. 따라서 차즈기 추출물은 ER stress로 유도된 XBP1의 mRNA 수준에 intron이 절단되는 것을 억제하는 효능이 있다.

(24) 차즈기 추출물의 ER stress-element (ERSE) activity 저해 효능 평가



**Fig. 24:** ER stress가 발생하고, p50 ATF6와 절단된 XBP1 mRNA가 ERSE에 결합하면서 하위 신호전달체계로 연결되어 죽상동맥경화증의 발달을 촉진한다. 실제로 ERSE에 결합하여 해당 element의 활성화를 거쳐 진행되는지 확인하기 위해 dual-luciferase assay를 이용해 실시하였다. 그 결과, tunicamycin을 처리한 그룹에서 발광에 대한 흡광도가 증가하였고, 차즈기 추출물을 처리한 그룹에서 발광도가 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 차즈기 추출물은 실제로 ER stress-element의 활성을 감소시키면서 억제하는 효능을 가진다.

(25) 차즈기 추출물의 단백질 합성능력 향상 효능 평가



**Fig. 25:** ER stress가 발생하면서 소포체의 고유능력이 단백질 합성의 기능이 상실하게되며, 이로써 단백질의 합성이 안되거나 비정상적으로 진행되는 unfolded protein response (UPR) 현상이 나타난다. 이 실험에서는 죽상동맥경화증에 관련된 대표적인 세 가지 바이오마커, ABCA1, SR-B1, ICAM1을 사용하여 각각의 단백질 발현을 확인하였다. 각 바이오마커의 유도제인 TO-091317, 산화 LDL, tumor necrosis factor-α (TNFα)를 처리하고, 여기에 ER stress를 유도하기 위한 tunicamycin을 처리하였다. 그 결과, tunicamycin을 처리한 각각의 그룹에서는 단백질의 발현이 감소, 즉, 단백질의 합성이 안된 것을 확인하였다. 여기에 차즈기 추출물을 10 µg/ml 농도로 처리한 결과 합성되지 않았던 단백질들의 발현이 다시 증가하게 되면서 ER stress로 유도된 UPR에서 합성능력을 증가시키는 효능을 나타냈다. 그러나 (B)에서는 차즈기 추출물이 SR-B1의 단백질 감소 효능이 있기 때문에 (A)와 (C)에서의 다른 단백질의 합성 회복능력보다는 더딘 회복력을 보이는 바 있다. 따라서 차즈기 추출물은 ER stress로 유도된 단백질의 합성능 저해를 회복하는 효능을 가진다.

7) 아래 Fig. 26는 중국산 차즈기의 MeOH 추출물에서 hexane 분획물의 효능을 소포체 스트레스를 통한 세포사멸을 통해 효능 평가하였다.

(26) 차즈기 추출물의 ER stress로 유도된 apoptosis 억제 효능 평가

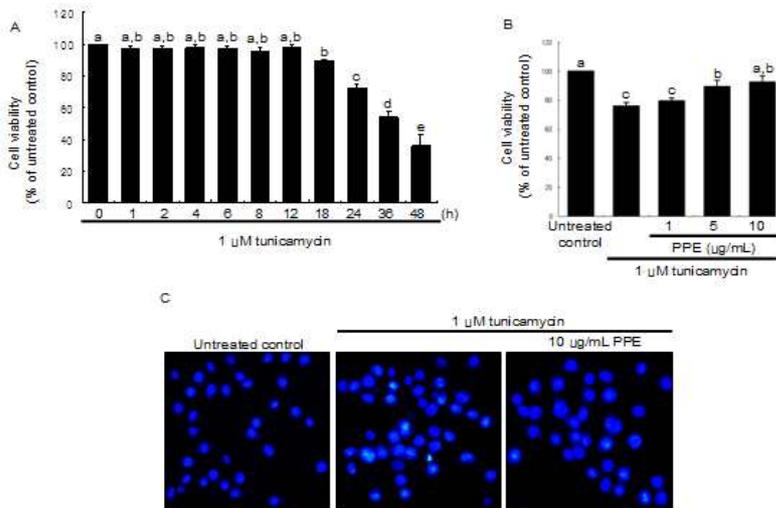
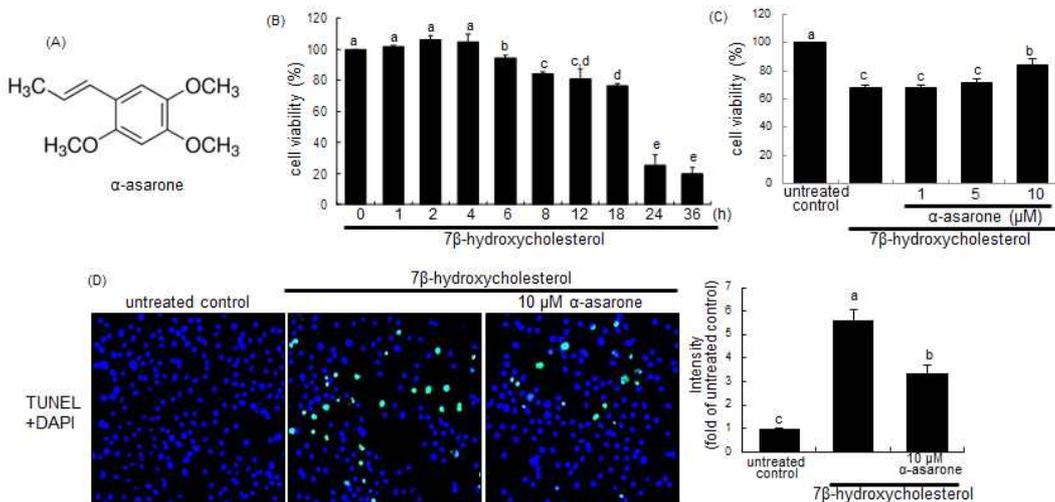


Fig. 26: ER stress는 unfolded protein들이 세포내 축적되어 세포사멸작용 (apoptosis)을 일으킨다. (A)와 (B)에서는 생존세포들을 count할 수 있는 MTT assay를 통해 확인한 결과이다. tunicamycin을 24시간 동안 처리하면 세포생존률이 70% 정도가 되며, 이 시간대를 선정하여 차즈기 추출물의

세포생존 회복능력을 확인하였다 (B). 그 결과, 차즈기 추출물은 농도의존적으로 세포생존률을 증가시키는 것을 확인하였다. 또한, apoptosis를 대표적으로 측정할 수 있는 세포 내 DNA가 분열 및 응축됨을 확인할 수 있는 hoechst 33258 염색법을 이용해 확인하였다 (C). 그 결과, tunicamycin을 처리한 그룹에서는 세포의 핵 내 DNA가 응축된 부분들이 염색되었으며, 10 μg/ml 농도의 차즈기 추출물을 처리한 그룹에서는 DNA 응축 부분들이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 차즈기 추출물은 ER stress로 유도된 apoptosis를 억제하는 효능을 가진다.

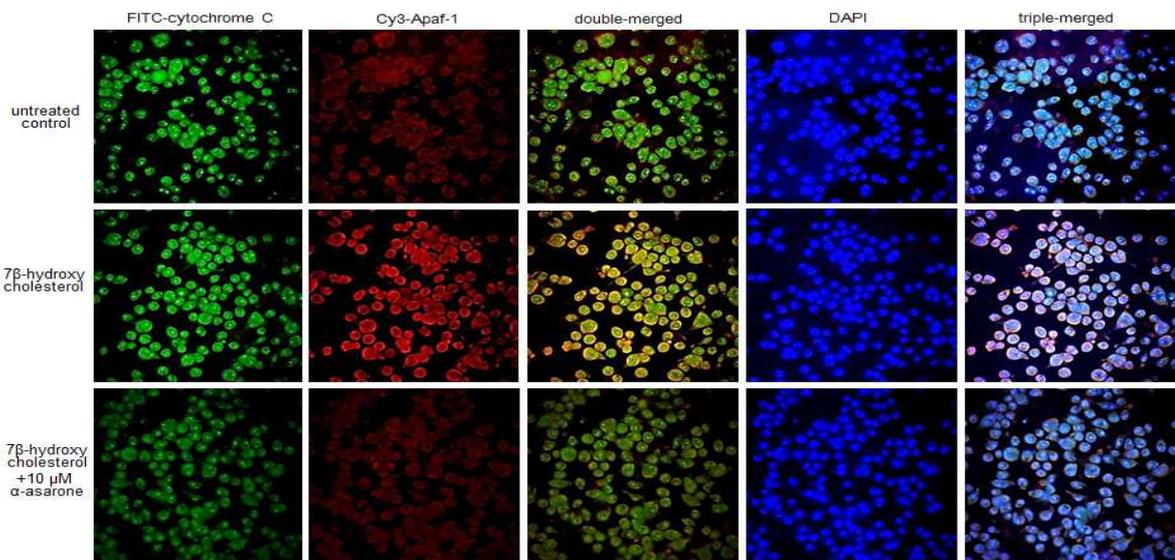
8) 아래 Fig. 27-35는 중국산 차즈기의 Hexane 분획물에서 분리 획득한 단일 유효 성분인 α-asarone의 효능을 소포체스트레스를 통한 세포사멸을 통해 효능 평가하였다.

(27) 차즈기 추출물 유효성분인 α-asarone의 macrophage apoptosis 억제 효능



**Fig. 27:** 차즈기 추출물에서 단일 유효성분을 확인한 결과,  $\alpha$ -asarone으로 제1협동기관에서 분리 및 확인하였다.  $\alpha$ -Asarone의 화학구조는 (A)에서 보는 것과 같다. 죽상동맥경화증의 발생과정에서 지질을 포함하는 죽종의 주요 성분인 macrophage들의 세포사멸은 주요 발병인자로 알려져 있다. 따라서 macrophage apoptosis를 측정하기 위해 MTT assay를 통해 확인한 결과, oxysterol인 시간대별로  $7\beta$ -hydroxycholesterol을 처리 후 18 시간부터 세포생존율이 70%정도로 감소되는 것을 확인하였다 (B). 또한,  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리하였을 때, 10  $\mu$ M에서 세포생존율을 회복하는 것을 확인하였다 (C). 세포의 apoptosis를 측정하는 다른 방법으로 DNA의 절편을 타겟으로 형광물질을 레이블하는 것을 확인할 수 있는 TUNEL assay를 이용해 확인하였다 (D).  $7\beta$ -hydroxycholesterol을 처리한 그룹에서는 초록색의 DNA절편 레이블 한 형광 염색이 증가된 것을 확인하였고, 10  $\mu$ M  $\alpha$ -asarone을 처리한 결과, DNA절편이 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 차즈기 추출물의 유효성분인  $\alpha$ -asarone은 macrophage apoptosis를 억제시킴으로써 죽상동맥경화증을 예방할 수 있다.

### (28) $\alpha$ -Asarone의 apoptosome형성 억제 효능-1



**Fig. 28:** 대식세포의 세포사멸에 관여하는 다양한 원인 중, apoptosome의 형성으로 인한 apoptosis의 기전연구에서  $\alpha$ -asarone의 효능을 확인해보았다. Apoptosome은 다양한 stress들에 의해 mitochondria에 존재하는 cytochrome C가 세포질로 분비되고, APAF1과 결합하여 apoptosome을 형성한다고 알려져 있다. 이번 연구에서는 초록색 형광물질인 FITC를 레이블 한 cytochrome C 항체와 붉은색 형광물질인 Cy3를 레이블 한 APAF1 항체를 사용해 immunocytochemistry를 통해 확인하였다. 먼저,  $7\beta$ -hydroxycholesterol을 처리한 그룹에서는 두 항체의 공동 구역인 노란색의 형광을 띠는 부분이 증가한 것을 확인하였고, 10  $\mu$ M  $\alpha$ -asarone을 처리한 결과 감소하는 것을 확인하였다. 따라서  $\alpha$ -asarone은 apoptosome의 형성을 억제함으로써 대식세포의 세포사멸을 억제하는 효능을 가진다.

(29)  $\alpha$ -Asarone의 apoptosome형성 억제 효능-2

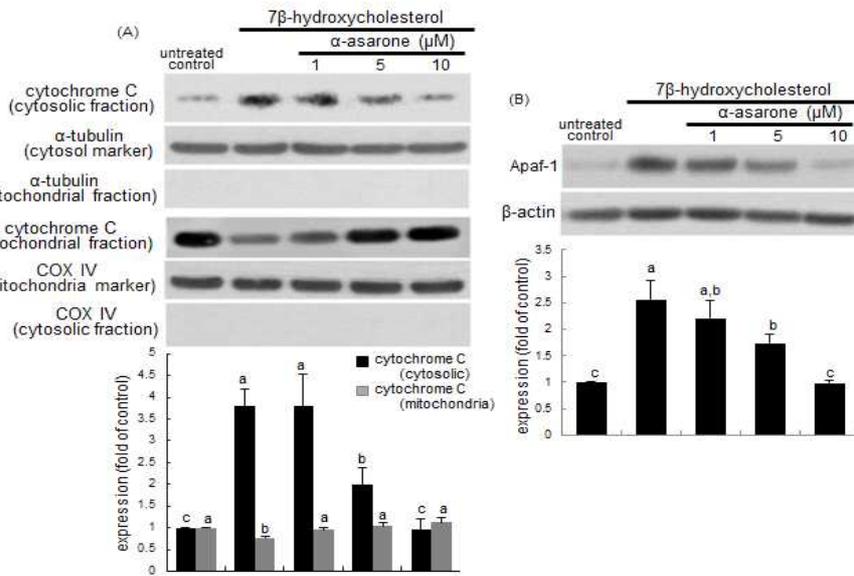


Fig. 29: Fig. 28에서

기술한 바와 같이

apoptosome의 구성성분에 해당하는 단백질들의 발현량을 western blot을 이용해 확인하였다.

7 $\beta$ -hydroxycholesterol을 처리한 그룹에서는 mitochondria로부터 세포질로 분비되는 cytochrome C의 양이 증가하였고,  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리한 결과

유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (A). 또한, APAF1 단백질 역시

7 $\beta$ -hydroxycholesterol처리로 증가된 발현량을  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리한 결과 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (B). 따라서  $\alpha$ -asarone은 apoptosome의 구성성분에 해당하는 cytochrome C의 세포질로의 분비 및 APAF1 단백질 발현량을 감소시킴으로써 apoptosome의 형성을 억제하는 효능을 가진다.

(30)  $\alpha$ -Asarone의 caspase절단 효소 activity 감소 효능

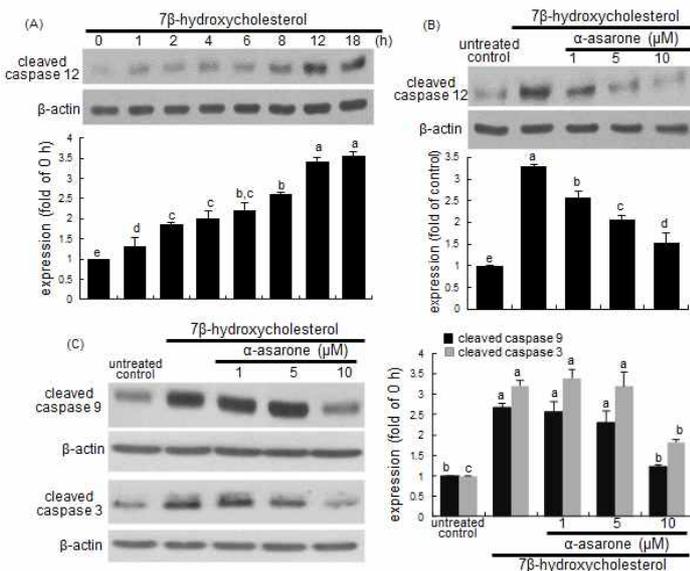


Fig. 30: 세포의 apoptosis를 유도하는

대표적인 바이오마커로 알려진

caspase들의 pathway에서  $\alpha$ -asarone의 효능을 확인하였다. 먼저 소포체에 존재하는 caspase12는 소포체스트레스를 통해 절단되면서 활성화된다.

Oxysterol을 시간대별로 처리하였을 때, caspase12의 절단정도를 western blot을 통해 확인한 결과, 12시간부터 단백질 발현이 증가하였고 (A),  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리한 결과 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (B).

Caspase12의 활성화에 따른 하위 신호

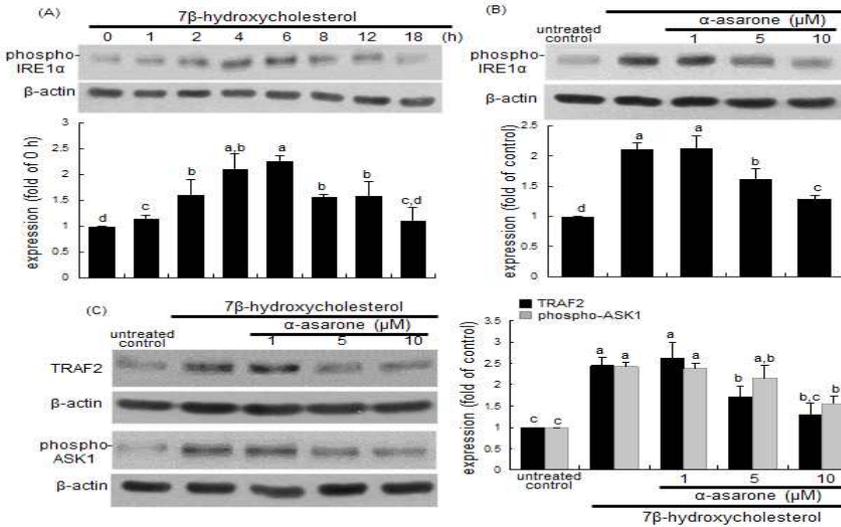
전달 단백질로서 caspase9과 caspase3의 활성화가 일어남으로써 세포사멸, apoptosis가

일어난다. Caspase9의 절단 형태를 western blot을 통해 확인한 결과, oxysterol을

처리함으로써 증가된 cleaved caspase9의 단백질 발현량이 10  $\mu$ M  $\alpha$ -asarone에 의해 감소되는 것을 확인하였다 (C). 또한, 하위 단계에 존재하는 caspase3 역시 caspase9과 유사한 결과를

보였다 (C). 따라서  $\alpha$ -asarone은 세포사멸 확인에 있어서 주요 바이오마커인 caspase 신호 전달계에서 caspase12를 통한 caspase9과 caspase3의 단백질 발현을 감소시킴으로써 세포사멸을 억제하는 효능을 가진다.

**(31)  $\alpha$ -Asarone의 소포체스트레스로 매개되는 세포사멸 억제 효능-1**

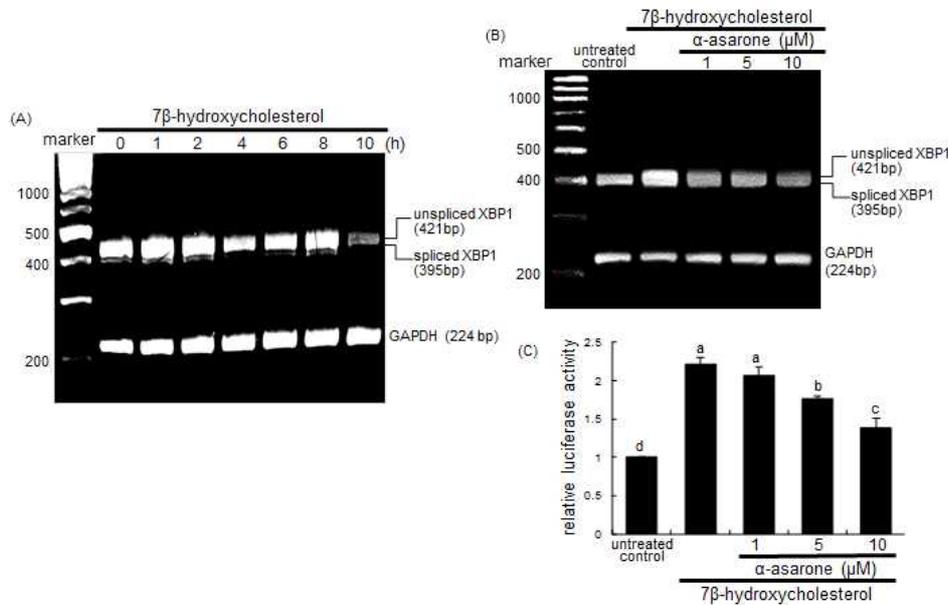


**Fig. 31:** 최근 소포체 스트레스는 세포 내 세포사멸을 유도하는 주요 위험인자로 알려지고 있다. 대표적인 소포체 스트레스 바이오마커인 IRE1α의 인산화를 통한 활성을 oxysterol을 처리하여 확인하였다. Oxysterol을 시간대별로 처리한 결과, 4-6시간에 phospho-IRE1α의 단백질 발현량이 가장

증가하였고 (A), 해당 시간에  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리한 결과, 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (B). 또한, IRE1α의 하위 단계에 존재하는 세포사멸 유도 신호전달 기전으로서 TRAF2의 단백질 발현과 ASK1의 인산화를 통한 활성화 정도를 western blot으로 확인하였다 (C). 그 결과, TRAF2와 phospho-ASK1의 단백질 발현량은 oxysterol을 처리함으로써 증가하였고,  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리한 결과 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 따라서  $\alpha$ -asarone은 소포체 스트레스를 통한 세포사멸을 억제하는 효능을 가진다.

**(32)  $\alpha$ -Asarone의 소포체스트레스로 매개되는 세포사멸 억제 효능-2**

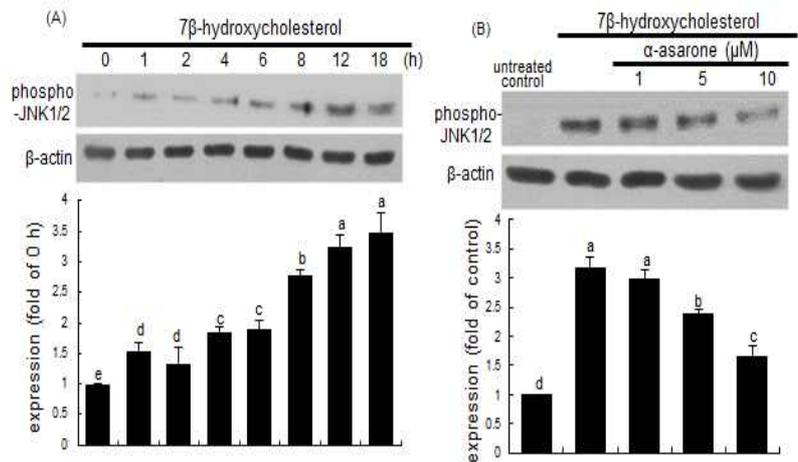
**Fig. 32:** IRE1α의 하위단계에서는 소포체 스트레스의 대표적인 생체 바이오마커인 XBP1의 splicing을 통한 ERSE promoter의 활성화가 나타난다. XBP1의 splicing정도는 RT-PCR을 통해 확인하였다. Oxysterol을 시간대별로 처리한 결과, 처리 후 2시간에 spliced XBP1의 transcriptional level이 증가하였고 (A), 해당 시간에  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리한 결과 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (B). 또한 ERSE (Endoplasmic reticulum stress element) promoter의 활성도를 측정하기 위해 Dual-luciferase assay를 이용해 확인하였다 (C). Oxysterol을 처리함으로써 ERSE promoter의 활성도가 증가되었고,  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리하였을 때, 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (C). 따라서  $\alpha$ -asarone은 소포체 스트레스를 통한 ERSE promoter의 activity를 감소시킴으로써 소포체 스트레스를 억제하는 효능을 가진다.



**(33) α-Asarone의 세포사멸 바이오마커인 JNK1/2 인산화 억제 효능**

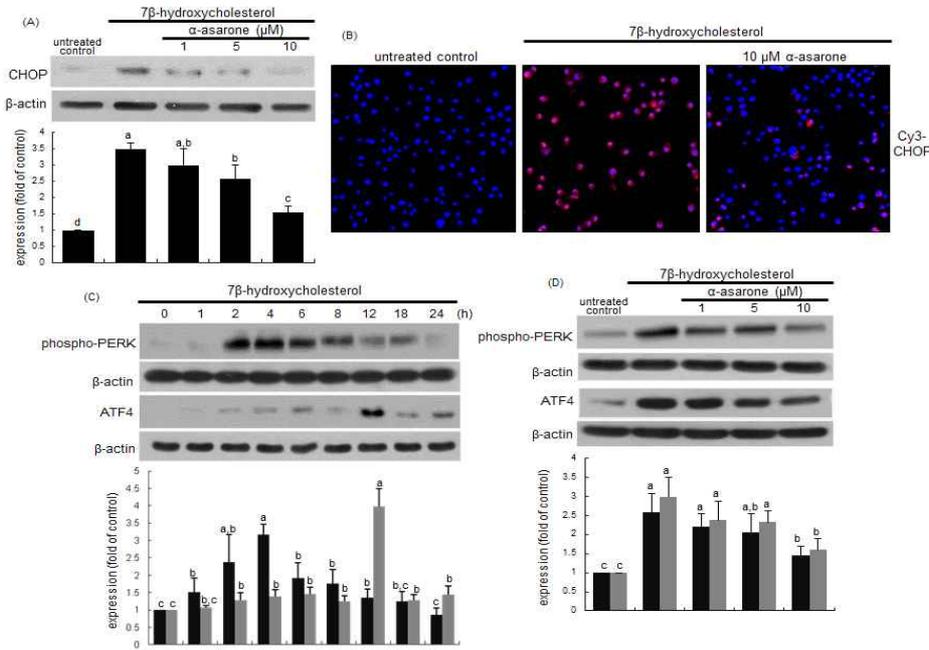
**Fig. 33:** 세포사멸 신호전달 기전은 다양하게 존재하지만, 가장 대표적으로 JNK1/2의 인산화가 있다. Oxysterol을 시간대별로 처리하여, phospho-JNK1/2의

단백질 발현을 western blot을 통해 확인하였다 (A). 그 결과, 처리 후 12시간부터 단백질 발현이 증가하였고 (A), α-asarone을 농도별로 처리한 결과, 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (B). 따라서 α-asarone은 세포사멸을 유도하는 대표적인 신호전달기전에서 phospho-JNK1/2의 발현을 억제함으로써 세포사멸을 억제하는 효능을 가진다.



**(34) α-Asarone의 소포체 스트레스로 매개하는 세포사멸 억제 효능**

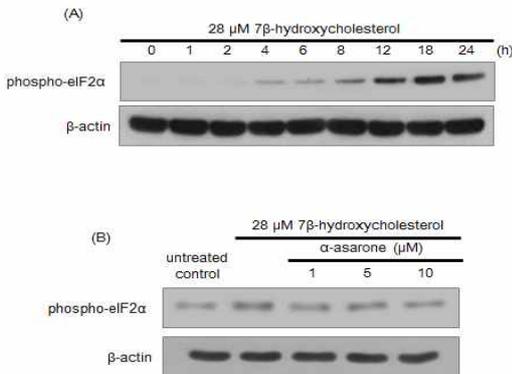
**Fig. 34:** 소포체 스트레스는 세포사멸을 유도하며, 소포체 스트레스를 매개로 세포사멸이 일어나는 대표적인 바이오마커로서 CHOP이 있다. CHOP의 단백질 발현을 western blot을 통해 확인한 결과 (A), oxysterol로 인해 증가된 CHOP의 단백질 발현량이 α-asarone을 농도별로 처리한 결과 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다 (A). 또한, 붉은색의 형광물질인 Cy3를 레이블한 CHOP 항체를 사용한 immunocytochemistry를 통해 확인한 결과 (B), oxysterol로 인해 붉은색으로 염색된 부분이 증가된 것을 확인하였고, 증가된 염색된 부분이 α-asarone을 처리함으로써 감소하는 것을 확인하였다 (B). 또한, CHOP의 발현은 소포체 스트레스를 인식할 수 있는 또 다른 바이오마커인 PERK을 통해 나타난다. PERK은 인산화를 통해 활성화되어 phospho-PERK의 단백질 발현을 western blot으로 확인한 결과, oxysterol을 시간대별로 처리하였을 때 (C), 4-8시간까지 단백질 발현이 지속된 것을 확인하였다. 또한, PERK의 하위 단계에 존재하는 ATF4의 단백질 발현 역시 oxysterol을 시간대별로 처리한



결과 12시간에 단백질 발현량이 증가한 것을 확인하였다 (C). 해당 시간대에 각각 α-asarone을 농도별로 처리한 결과, 10 μM α-asarone이 phospho-PERK과 ATF4 단백질 모두를 감소시키는 것을 확인하였다 (D). 따라서 α-asarone은 PERK-ATF4-CHOP의 단백질 발현을 억제함으로써 세포사멸을

억제하는 효능을 가진다.

### (35) α-Asarone의 phospho-eIF2α 단백질 발현 억제 효능



**Fig. 35:** Fig. 34에 PERK의 하위 단계에 존재하는 eIF2α는 인산화로 인해 활성화되며, 세포사멸에 관계된 다양한 세포 기전을 조절하는 역할을 담당한다.

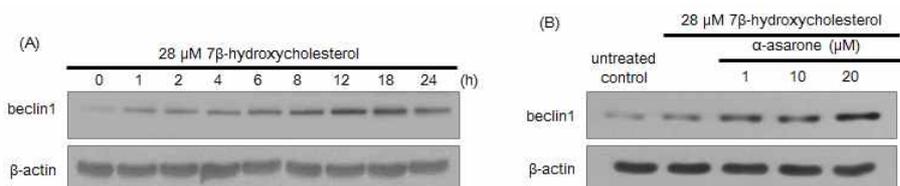
Oxysterol을 시간대별로 처리하여 phospho-eIF2α의 단백질 발현을 western blot을 통해 확인한 결과 (A), 처리 후 12시간부터 단백질 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 해당시간에 α-asarone을 농도별로 처리한 결과 phospho-eIF2α의 단백질 발현이 감소한 것을

확인하였다. 따라서 α-asarone은 소포체 스트레스로 인한 다양한 세포사멸 기전을 조절하는 주요 역할자인 eIF2α의 활성화를 억제함으로써 세포사멸을 억제하는 효능을 가진다.

9) 아래 Fig. 36-38는 중국산 차즈기의 hexane분획물에서 분리 및 획득한 α-asarone의 효능을 macrophage autophagy를 통해 평가하였다.

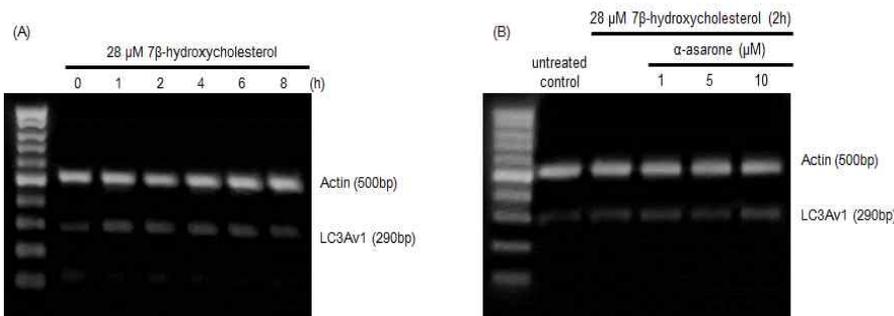
### (36) α-Asarone의 macrophage autophagy 촉진 효능-1

**Fig. 36:** 최근에는 대식세포에서 세포사멸을 억제하는 기전으로 자가소화반응(autophagy)가



활성화된다고 알려지고 있으며, 대식세포의 autophagy가 촉진될수록 죽상동맥경화증의 발생이 억제된다고 알려져있다. 세포의 autophagy를 확인할 수 있는 대표적인 바이오마커인 beclin1의 단백질 발현을 western blot을 통해 확인하였다. 시간대별로 oxysterol을 처리한 결과 (A), 처리 후 12시간부터 단백질 발현이 증가하였고,  $\alpha$ -asarone을 처리한 결과 (B), oxysterol을 처리한 그룹보다 증가되는 것을 확인하였다. 따라서  $\alpha$ -Asarone은 대식세포의 autophagy를 촉진함으로써 세포사멸을 억제하여 죽상동맥경화증을 예방할 수 있는 효능을 가진다.

**(37)  $\alpha$ -Asarone의 macrophage autophagy 촉진 효능-2**

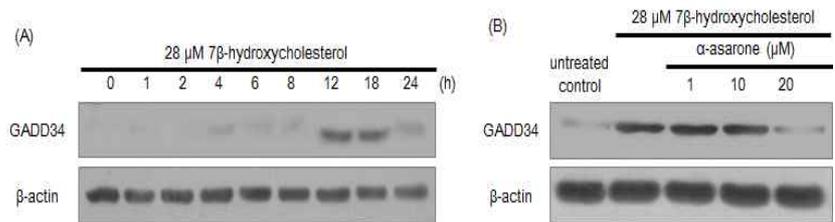


**Fig. 37:** Fig. 36에서 확인한 autophagy의 대표적인 바이오마커인 beclin1 이외에 LC I 에서 II로 전환되는데 관여하는 transcriptional factor인 LC3A variant1 (LC3Av1)을 RT-PCR을

이용해 확인하였다. 시간대별로 oxysterol을 처리한 결과, 처리 후 2시간이 transcriptional level이 증가하였다 (A). 해당 시간대에  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리한 결과 10  $\mu$ M  $\alpha$ -asarone을 처리한 그룹에서 증가되는 것을 확인하였다 (B). 따라서  $\alpha$ -asarone은 beclin1과 LC3Av1의 단백질 및 transcriptional level을 촉진함으로써 macrophage autophagy를 통해 세포사멸을 억제하는 효능을 가진다.

**(38)  $\alpha$ -Asarone의 세포사멸 억제에 대한 GADD34의 단백질 발현 억제 효능**

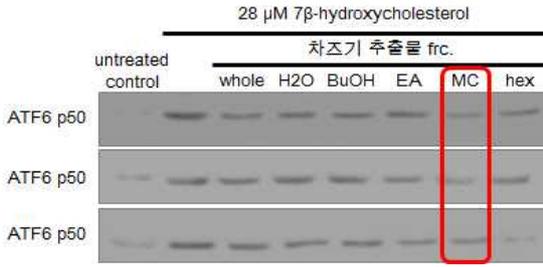
**Fig. 38:** Fig. 34에서 기술한 CHOP의 하위 단계에 존재하는 세포사멸을 확인할 수 있는 대표적인 바이오마커인 GADD34의 단백질 발현을



western blot을 통해 확인하였다. Oxysterol을 시간대별로 처리한 결과, 12-18시간까지 단백질 발현이 유지되는 것을 확인하였고 (A), 해당시간에  $\alpha$ -asarone을 농도별로 처리한 결과 발현량이 감소되는 것을 확인하였다. 따라서 세포사멸을 담당하는 GADD34의 단백질 발현을  $\alpha$ -asarone이 감소시킴으로써 세포사멸을 억제하는 효능을 가진다.

10) 아래 Fig. 39-40는 중국산 차즈기의 hexane분획물 이외의 methyl chloride 분획물에서 효능을 소포체스트레스를 통해 효능 평가하였다.

(39) 차즈기 추출물의 methyl chloride fraction의 소포체 스트레스 억제 효능

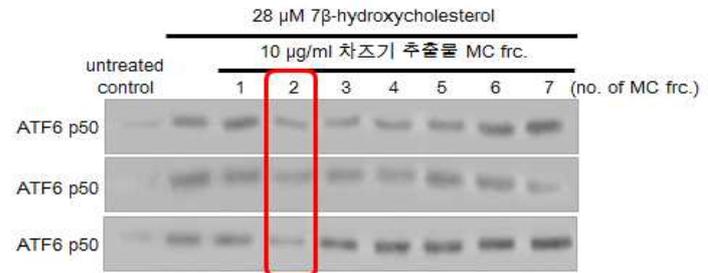


**Fig. 39:** 차즈기 추출물의 콜레스테롤 유입/유출에 대한 유효성분은 hexane fraction에서 분리한  $\alpha$ -asarone인 것을 확인하였다. 또한,  $\alpha$ -asarone이 죽상동맥경화증에서 나타나는 소포체스트레스를 통한 세포사멸에 대한 신호기전을 억제하는 효능을 확인하였다. 해당 연구팀은 소포체스트레스에 대한

다양한 차즈기 추출물의 fraction의 효능을 확인하고자 소포체 스트레스를 확인할 수 있는 바이오마커인 ATF6의 p90에서 p50으로의 절단을 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과, 기존의  $\alpha$ -asarone이 존재하는 hexane fraction층보다 methyl chloride fraction층에서 우수한 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

(40) 차즈기 추출물의 MC fraction에서 유효성분 존재하는 세부 fraction 스크리닝

**Fig. 40:** 차즈기 추출물의 MC fraction에서 우수한 소포체 스트레스 억제능을 Fig. 35에서 확인하였다. 해당 연구팀은 MC fraction에서 보다 세부적으로 fraction을 나누어 단일 유효성분을 검색하고자 세부fraction에



대한 소포체 스트레스 억제 효능을 확인하였다. 따라서 MC fraction을 세부적으로 7개로 나누어 획득하고, 소포체 스트레스를 확인할 수 있는 바이오마커인 ATF6의 p90에서 p50으로의 절단 정도를 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과, 세부 2번 fraction에서 가장 억제 효능을 뛰어난 것을 확인하였다. 해당 세부 fraction에서 단일 화학구조를 가진 유효성분을 확인하는 작업은 협동 1에 전달해 진행 중에 있다.

11) 아래 Table. 1과 Fig. 41-42는 중국산 차즈기의 hexane 분획물 및 유효 성분인  $\alpha$ -asarone의 효능을 apoE KO mouse를 통해 효능 평가하였다.

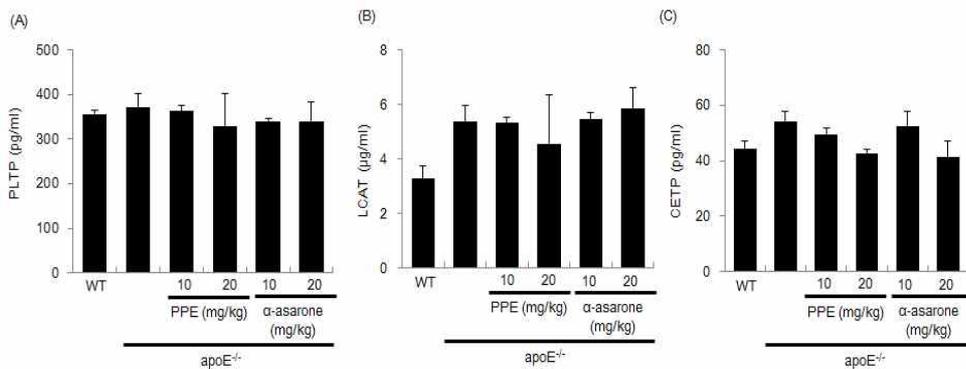
Table. 1 : 혈청 지질 성분 분석

	wild type +control diet	wild type +Paigen's diet	apoE KO +Paigen's diet	apoE KO +10 mg/kg 차즈기	apoE KO +20 mg/kg 차즈기	apoE KO +10 mg/kg asarone	apoE KO +20 mg/kg asarone
Total cholesterol	114.446 ±4.532	217.993 ±12.760	1407.742 +87.864	1194.810 +42.510	1439.273 ±47.232	1463.927 ±126.540	1767.474 ±70.467
HDL -cholesterol	76.058 ±3.146	56.077 ±7.819	13.702 ±3.680	4.872 ±1.428	29.423 ±0.577	11.442 ±0.743	39.872 ±8.886
LDL -cholesterol	48.825 ±4.268	170.381 ±17.456	1411.462 +89.798	1206.595 +41.990	1422.938 ±50.224	1466.720 ±125.661	1739.047 ±76.719
Triglycer	37.181	42.323	87.110	83.286	65.439	71.176	57.224

ide	±2.952	±6.265	±7.791	±8.994	±17.847	±3.528	±15.588
VLDL	7.436 ±0.590	8.465 ±1.253	17.422 ±1.558	16.657 ±1.799	13.088 ±3.569	14.235 ±0.706	11.445 ±3.118
Atherosclerosis Index (AI)	0.508 ±0.061	3.367 ±0.964	220.882 ±78.973	282.144 ±68.251	47.904 ±0.646	126.770 ±6.367	49.006 ±12.810

ApoE KO mouse에 10/20 mg/kg/body weight(BW)의 차즈기 추출물과 α-asarone을 12주동안 매일 경구투여하고, 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고, 분리된 혈청을 이용해 다양한 지질성분을 측정하였다. 그 결과, apoE KO mouse에서는 total cholesterol (TC), LDL-cholesterol, triglyceride (TG), VLDL 모두 높은 수치를 기록했으며, TG부문에서 10/20 mg/kg/BW α-asarone을 경구투여한 그룹에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 반면, HDL-cholesterol은 apoE KO mouse 그룹에서 현저히 낮아진 것을 확인하였고, 20 mg/kg/BW 차즈기 추출물과 α-asarone을 경구투여한 그룹에서 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 다음의 결과를 토대로 동맥경화지수인 atherosclerosis index (AI)를 수치화한 결과, apoE KO mouse에서는 상당히 높은 지수가 나타났으나 20 mg/kg/BW 차즈기 추출물과 10/20 mg/kg/BW α-asarone을 경구투여한 그룹에서 유의적으로 낮아지는 것을 확인하였다. 따라서 차즈기 추출물과 α-asarone은 20 mg/kg/BW의 농도로 경구투여할 때, 혈청의 지질 성분들이 정상에 가까운 수준으로 회복되는 것을 확인하였다.

**(41) 차즈기 추출물 및 α-asarone의 apoE KO mouse에서 reverse cholesterol transport (RCT)에 관련된 혈청 효소의 조절 효능**



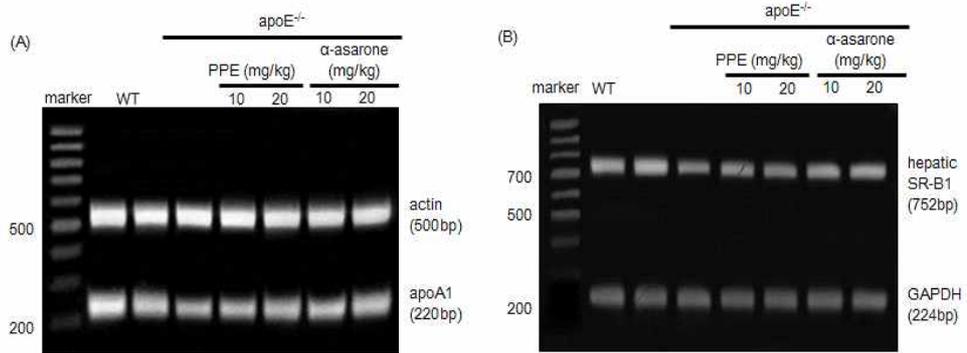
**Fig. 41:** RCT란 혈액에 존재하는 다량의 콜레스테롤을 간으로 보내 제거하는 작용으로 동맥경화증에서의 RCT는 호의적 결과를 유도한다. RCT에 관련된 다양한 효소인

PLTP, LCAT, CETP를 ELISA를 통해 plasma에서 확인하였다. PLTP는 어떠한 경향도 보이지 않았고 (A), LCAT은 apoE KO mouse 그룹에서는 wild type 그룹보다 증가하였지만 다양한 농도의 차즈기 추출물과 α-asarone을 경구투여한 그룹에서는 경향을 보이지 않았다 (B). 그러나 CETP의 level에서는 20 mg/kg/BW 차즈기 추출물과 α-asarone이 apoE KO mouse에서 증가된 CETP level을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 따라서 20 mg/kg/BW 차즈기 추출물과 α-asarone은 혈액 내 CETP의 효소 수준만 조절함으로써 죽상동맥경화증을 완화할 수 있는 효능을 가진다.

(42) 차즈기 추출물과 α-asarone의 hepatic apoA1과 SR-B1 촉진 효능

Fig. 42: 혈액 내

HDL-cholesterol은  
죽상동맥경화증에서  
매우 중요한 예방  
인자로 알려져 왔으며,  
apoA1은 간에서  
생성되어 혈액으로  
분비되기 때문에 간



조직에서 RNA를 분리 및 RT-PCR을 통해 확인하였다 (A). 그 결과, apoE KO mouse에서 현저히 감소된 apoA1의 생성이 20 mg/kg/BW의 차즈기 추출물과 α-asarone을 경구투여한 그룹에서 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 간에서 HDL의 receptor인 SR-B1 역시 RT-PCR을 통해 확인한 결과 (B), apoE KO mouse 그룹에서 현저히 감소되었고, 10/20 mg/kg/BW α-asarone을 경구투여한 그룹에서 회복되는 것을 확인하였다. 따라서 두 마커를 종합한 의견으로써 20 mg/kg/BW α-asarone을 처리한 그룹에서 apoA1의 생성 및 hepatic SR-B1의 활성이 증가되는 것을 확인하고 이로써 α-asarone은 혈액 내 HDL-cholesterol을 조절하는 데 중요한 역할 및 효능을 가진다.

2. 제2세부과제: 차즈기 소재의 콜레스테롤 생합성 및 흡수 저해활성 평가

(1) 장 내피세포(CaCo-2)를 이용 차즈기 추출물의 장 내피세포 세포배양에서 콜레스테롤 흡수 저해능 평가

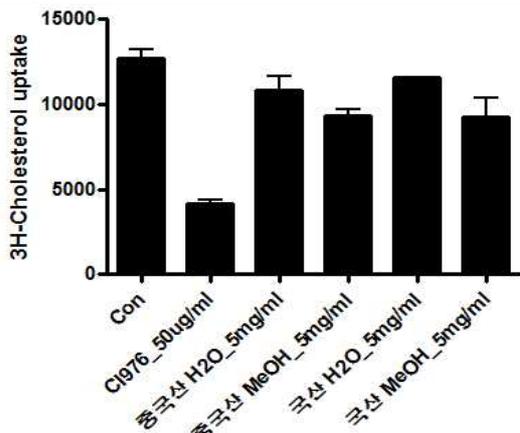


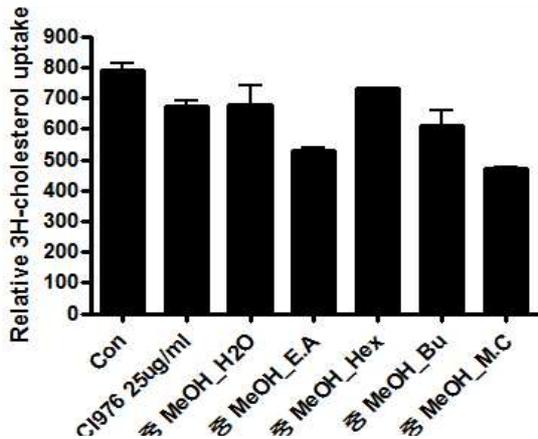
Fig. 1: 차즈기 추출물의 분획별 시료를 이용하여 장 내피세포 (CaCo-2)에서의 콜레스테롤 흡수능을 측정하기 위해 6-Well plate에 0.15 X 10<sup>6</sup> cell/mL 이 되도록 세포를 분주하고 4 - 7일간 배양하였다. 이것을 F-12 배양액 (0.1uci/well [1,2-<sup>3</sup>H] - cholesterol)과 차즈기 측정 샘플을 넣고,6시간 동안 배양하였다. 6시간 배양 후, 배양액과 세포 추출물을 모으고 3mL의 Ultima Gold scintillant를 첨가해 liquid scintillation을 β-scintillation counter로

측정하였다. 측정 시료는 콜레스테롤 흡수 저해제인 양성 대조군으로 CI976 (50µg/mL)과 차즈기 시료 중 중국산과 국산의 H<sub>2</sub>O, MeOH (5mg/mL) 분리층을 사용하였다.

실험 결과, 대조군에 비해 양성 대조군인 CI976이 콜레스테롤 흡수 수치를 60 % 이상 감소시켰고, 차즈기 추출물의 경우, 중국산과 국산 차즈기의 H<sub>2</sub>O 분리층이 10 % 가량 감소시킨 것을 확인하였다. 또한 중국산과 국산 차즈기의 MeOH 분리층이 H<sub>2</sub>O 분리층보다 콜레스테롤 흡수 저해 효과가 우수함을 확인하였다.

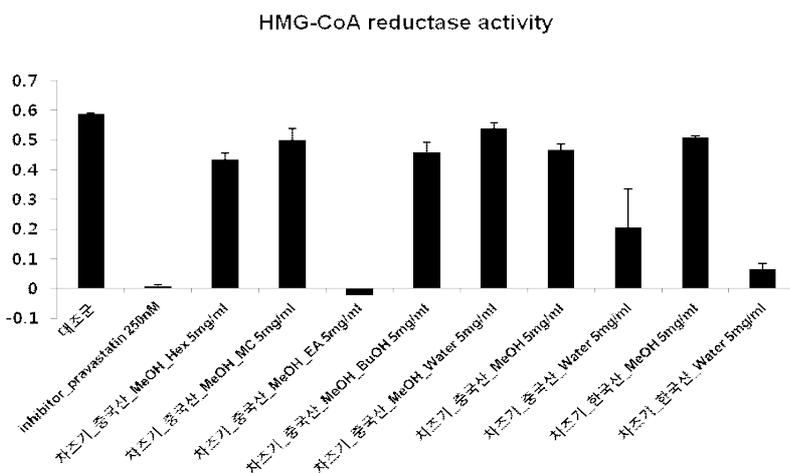
위 결과에 따르면 차즈기 시료 모두가 콜레스테롤 흡수 저해능을 갖는 것으로 보이며, 중국산과 국산 차즈기 시료의 효능은 비슷하였으나, 특히 MeOH 분리층 시료가 콜레스테롤 흡수저해능이 H<sub>2</sub>O 분리층보다 높은 것을 확인하였다.

(2) 중국산 차즈기 시료의 세분화된 분획층을 이용하여 콜레스테롤 흡수능을 측정



**Fig. 2:** 차즈기 추출물의 다양한 용매별 분획물을 이용해 콜레스테롤 흡수능을 측정하였다. 양성 대조군인 CI976 (25µg/mL)의 콜레스테롤 흡수 저해능과 비교했을 때, 대부분의 분획층 시료들이 콜레스테롤 흡수능 저해 효과를 나타냄을 알 수 있으며, 그 중 Ethyl acetate (EA)층과 Methylene chloride (MC)층의 콜레스테롤 흡수 저해능이 뛰어남을 확인할 수 있었다.

(3) 차즈기 시료의 분획별 HMG-CoA reductase 활성 억제능 측정

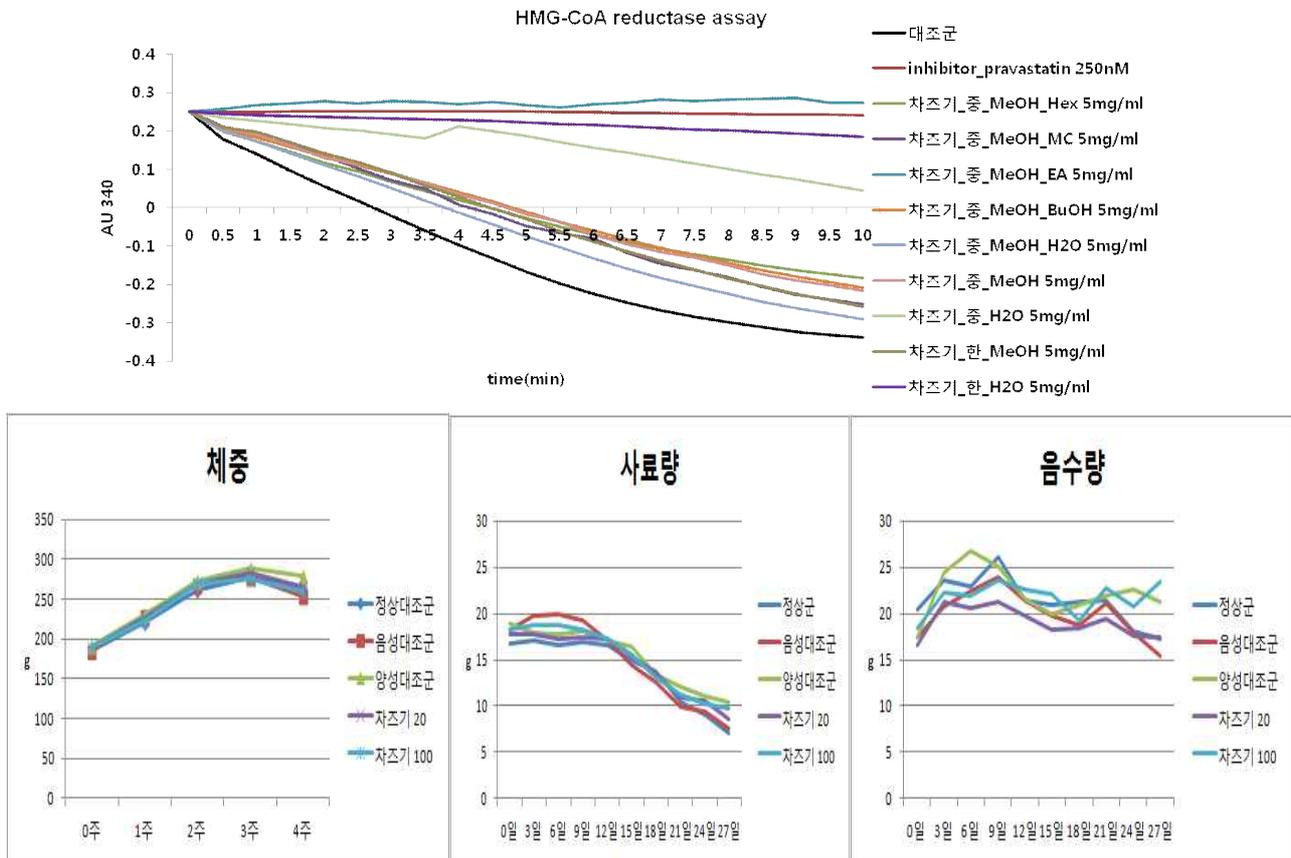


**Fig. 3:** 차즈기 분획물들이 간에서 콜레스테롤을 합성하는 과정에 있어서 중요한 효소인 HMG-CoA reductase의 활성을 저해하는지 알아보기 위해 HMG-CoA reductase activity를 통해 확인하였다. HMG-CoA reductase assay kit를 사용하여 각각의 차즈기 분획물들과 양성 대조군인 pravastatin, 그리고 HMG-CoA 반응 용액을

첨가하여, 효소 반응 시작과 동시에 340nm에서 10분간 30초 간격으로 흡광도의 변화를 확인하였다.

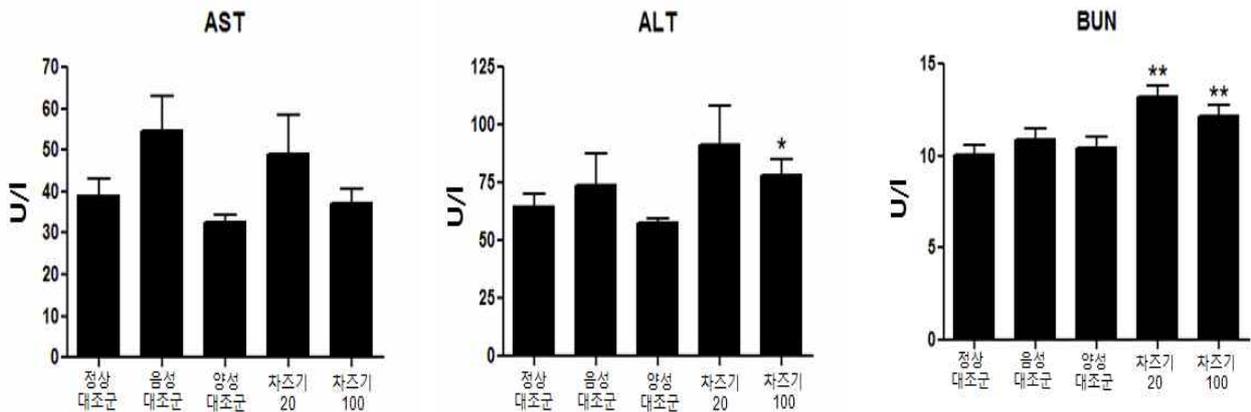
**실험 결과,** 대조군에 비해 HMG-CoA reductase의 저해제인 pravastatin의 경우 HMG-CoA reductase의 활성이 뚜렷하게 감소하였고, 이와 유사한 양상으로 차즈기 분획물 중, Ethyl acetate (EA)분획층과 한국산 차즈기 H<sub>2</sub>O 추출물의 콜레스테롤 합성 저해능이 뛰어났다. 저해제인 pravastatin만큼의 효과는 나타내지 않지만, 중국산 H<sub>2</sub>O 추출물 역시 HMG-CoA reductase의 활성을 감소시키는 양상을 가지는 것을 확인하였다.

#### 4) 차즈기 추출물 식이에 의한 실험쥐의 체중, 식이, 음용수 섭취량



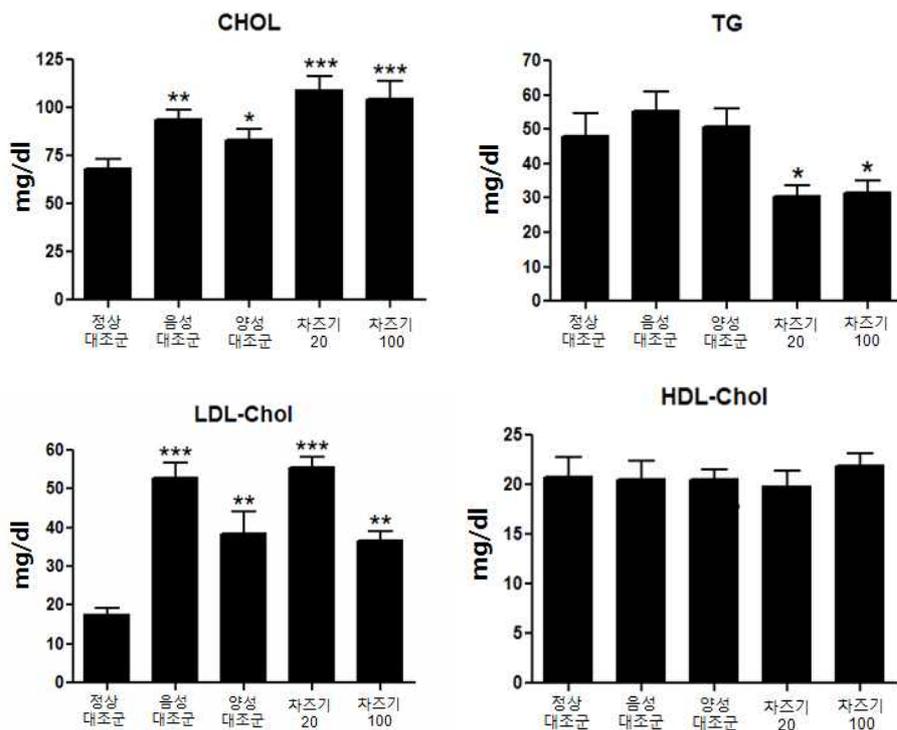
**Fig. 4:** 본 실험에 사용한 실험식이는 AIN-93(American Institute of Nutrition,1982)에 의거한 사료를 구입하였고, 1.25% 콜레스테롤이 포함된 사료(피드랩, 대전, 한국)를 구입하여 사용하였다. 실험동물은 최적조건(온도 20±1℃, 습도 50±10%, 명암주기 07:00~19:00)에서 예비 사육한 외관상 건강한 평균체중 150±10 g의 Sprague Dawley(SD) 수컷 흰쥐를 난괴법에 의해 10마리씩 5군으로 나누고 4주간 사육하였다. 기본 실험 식이조성은 일반사료와 1.25% 고콜레스테롤 (Research Diets) 식이를 하였고, 처리군은 정상군, 음성대조군, 양성대조군(Atrovastatin 3mg/kg/day), 차즈기추출물 20 mg/kg/day, 차즈기추출물 100 mg/kg/day의 농도로 물에 녹여 존데를 이용하여 매일 경구 투여하였다. 실험사육기간 중 실험동물의 체중은 주 1회 식이, 음용수 섭취량은 주 3회 일정한 시간에 측정하였다. 혈액 채취 후 간과 신장, 비장, 심장을 적출하여 지방 등을 깨끗이 제거한 후 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 결과 음성대조군, 양성대조군, 처리군사이에 체중, 식이량, 음용수섭취량에서 큰 차이를 주지 않았다. 이는 atrovastatin, 차즈기추출물의 투여에 의해 식욕 및 갈증을 저해하거나 증가시키지 않아서 측정하고자하는 수치의 신뢰도를 더 높여주는 것으로 판단된다.

5) 차즈기 추출물의 간/신장독성에 대한 영향



**Fig. 5:** 본 실험 식이조성은 일반사료와 1.25% 고콜레스테롤 (Research Diets) 식이를 하였고, 처리군은 정상군, 음성대조군, 양성대조군(Atrovastatin 3mg/kg/day), 차즈기추출물 20 mg/kg/day, 차즈기추출물 100 mg/kg/day의 농도로 물에 녹여 존대를 이용하여 매일 경구 투여하였다. 실험사육기간 중 실험동물의 체중은 주 1회 식이, 음용수 섭취량은 주 3회 일정한 시간에 측정하였다. 혈액 채취 후 간과 신장, 비장, 심장을 적출하여 지방 등을 깨끗이 제거한 후 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 간독성의 표지자인 GOT, GPT 신장독성의 표지자인 BUN을 측정하여 비교분석하였다. 간독성을 나타내는 AST, ALT에서는 음성대조군에 비해 약간 높거나 비슷하게 나타나서 차즈기추출물이 간에는 특별한 독성을 보여주지 않았다. 그러나 신장독성을 보여주는 혈액내 BUN의 활성이 신뢰성 있게(95%) 다소 높게 나타났다.

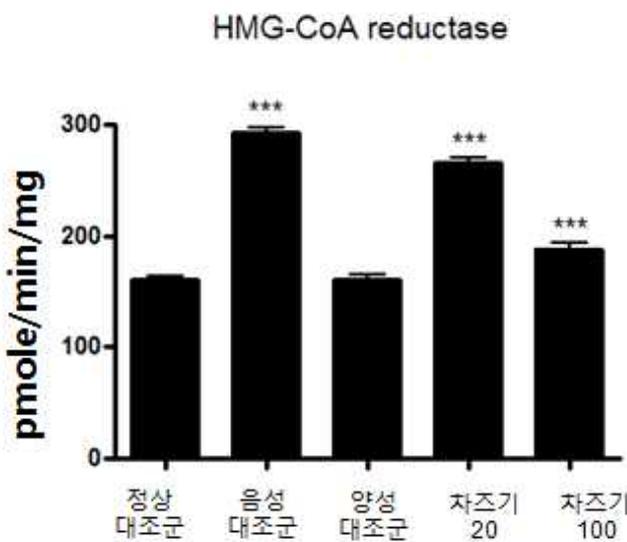
6) 차즈기 추출물의 혈액내 콜레스테롤 및 TG 농도에 대한 영향



**Fig. 6:** 4주간 사육 후 실험종료 전 실험동물을 16시간 절식시키고 CO2 마취시킨 후 경추 탈골법에 의하여 도살하고, 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액 채취 후 간과 신장, 비장, 심장을 적출하여 지방 등을 깨끗이 제거한 후 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 혈청 시료는 분석 전까지 -70°C 냉동고에서 보관하였다. 혈액생화학측정기를 이용하여 혈청내의 중성지방, 총콜레스테롤, HDL콜레스테롤, LDL콜레스테롤을 측정하여 비교분석하였다.

결과 혈액내 HDL-cholesterol의 농도에는 거의 영향을 주지않았으나, LDL-cholesterol의 농도는 차즈기추출물 100 mg/kg/day 투여군에서는 99%의 신뢰도로 양성대조군인 Atrovastatin의 수준으로 감소시켰음. total cholesterol도 마찬가지로 차즈기 추출물 100 mg/kg/day 투여군에서 99%의 신뢰도로 농도를 감소시켰다. 예상하지 못하게 차즈기 추출물 투여군에서 혈액내의 TG 농도를 약 50%정도 감소시키는 결과를 보여주었다. 그 기전은 아직 설명할 수 없으나 차즈기 추출물이 체지방 감소효과가 우수하다는 결과를 보여주었다.

7) in vivo 간조직에서 콜레스테롤 대사 효소활성 측정



**Fig. 7:** 간조직에서 homogen과 원심분리법을 통한 microsome 분리 -2차년도에 차즈기 추출물을 투여하였던 SD rat로부터 잘라내어 -70°C에 냉동보관한 간조직을 꺼내어 3배의 cold medium I (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-C1, pH 7.4)에 녹인 후 glass homogenizer로 잘게부수고, 22,00g에서 15분 원심분리한다. 상층액을 다시 100,000g에서 1시간 원심분리하여 침전물을 cold medium I에 녹이고, 100,000 g에서 다시 1시간을 원심분리하고 침전물을 얻었다. 침전물을 EDTA가 없는 cold medium I에 녹이고,

단백질 농도를 Lowery방법으로 측정하였다.

분리한 microsome으로 HMG-CoA reductase의 활성 측정-HMG CoA Reductase 활성측정은 Bach 등의 방법에 의해 측정하였음. 60 µl의 최종부피의 반응(eppi-tube)에 10 - 20 ug의 microsome protein extract, 100 mM KxPO4, 4.2 mM EDTA, 13.3 mM DTT, 100 ug의 bovine serum albumin, 5.5 mM glucose 6-phosphate, 10 mU glucose-6-phosphate dehydrogenase, 600 IM NADPH 와 30 IM (approximately 0.1 lCi) DL-3-[Glutaryl-3-<sup>14</sup>C]-HMG-CoA (PerkinElmer, Boston, Massachusetts, USA)을 넣고, 37°C에서 30분간 반응시키고, 60 µl의 HCl: methanol (3:1)을 가하여 반응을 멈추게 하였다. 반응액을 실온에서 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액 25 µl을 silica gel thin-layer chromatography에 점적하고, toluene:acetone (1:1) 를 전개용매로하여 분리하였음. phosphor

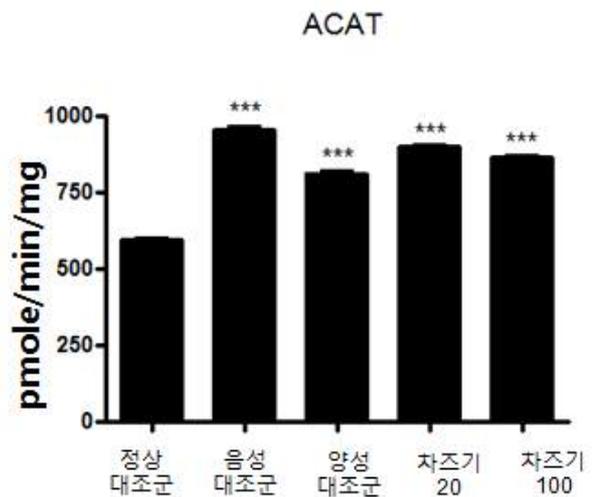
image screen에 노출하여 위치를 아는 labeled mevalonolactone 밴드를 잘라내고 liquid scintillation 요액에 넣어 scintillation countin을 하고, HMGR-specific activity를 측정하였다.

**실험결과:** 양성대조군인 atrovastatin (HMG-CoA reductase 저해제)을 투여한 군에서 예상대로 콜레스테롤합성의 첫 단계 효소인 HMG-CoA reductase 효소 활성은 상당히(약 50%까지) 저하되어 있었다. 고콜레스테롤식을 주지 않은 음성대조군에서도 예측대로 효소활성이 낮았다. 20 mg/kg/day 차즈기추출물 투여군에서 HMG-CoA reductase 효소 활성은 10%정도 감소하였으며, 100 mg/kg/day 차즈기추출물 투여군에서는 약 40%까지 효소활성이 감소하여, 차즈기추출물의 콜레스테롤 감소활성이 많은 부분 HMG-CoA reductase 효소 활성의 감소 때문으로 판단된다.

### 8) 분리한 microsome으로 콜레스테롤 합성 효소인 ACAT의 효소 활성 측정

**Fig. 8:** Lichenstein and Brecher에 의해 기술한

방법으로 분석하였음. 60 µg의 microsomal protein을 bovine serum albumin (fatty acid-free, 3 mg/ml)과 2 mM dithiothreitol을 포함하는 0.1M Sodium phosphate buffer(pH 7.4, assay buffer) 170 µl에 녹인다. 5 µl DMSO에 희석한 Drug dilutions (5 µl DMSO/200 µl total incubation volume)을 만들었다. DMSO는 이조건에서 ACAT activity를 저해하지 않았다. 반응은 [<sup>14</sup>C]oleyl-CoA (18 nM, 0.15 µCi, 8.3 nCi/nmol)를 포함하는 assay buffer 25 µl를



첨가함으로써 시작시키고 (반응액에 최종농도는 90 µM oleyl-CoA(cold), 90 µM albumin and 2 mM dithiothreitol임), 5분 후에 4 ml의 10 µg/ml 의 cold cholesterol oleate를 포함하는 chloroform-methanol 2:1을 첨가함으로써 정지시키고 [<sup>3</sup>H]cholesteryl oleate는 recovery계산을 위한 internal standard로 사용하였다. Lipid extract를 cloroform에 녹이고 Silica Gel G(TLC plate)에 점적하고, hexane-petroleum ether-acetic acid 80:20:1에서 전개하였다. unlabeled, carrier cholesteryl oleate를 internal standard로 사용하여 I<sub>2</sub> 증기에 의해 band가 보이도록 하였다. cholesteryl oleate band를 긁어서 scintillation vial에 넣고 radioactivity를 liquid scintillation spectroscopy에 의해 측정함 각 물질(inhibitor)에 대해 5가지 농도에 두 반복 실험을 수행하였다.

**실험결과:** 양성대조군인 atrovastatin (HMG-CoA reductase 저해제)을 투여한 군에서 콜레스테롤합성의 esterifying 효소인 ACAT (acyl-CoA:cholesterol acyltransferase) 효소 활성은 약 10%정도 저하되어 있었음. 고콜레스테롤식을 주지 않은 음성대조군에서는 예측대로 효소활성이 낮았다. 20 mg/kg/day 또는 100 mg/kg/day 차즈기추출물 투여군에서 모두 ACAT 효소 활성은 약간 감소하는 경향을 보였으며, 차즈기추출물이 콜레스테롤의 간조직에서 세포내 저장, lipoprotein assembly 등의 콜레스테롤의 유동성에 영향을 많이 주지 않는 것으로 판단된다.

### 3. 제1협동과제:

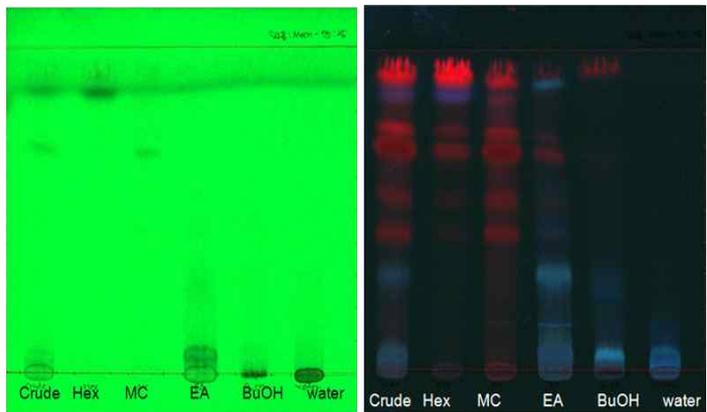
제품의 표준화, 기준규격 설정 및 안정성 평가 및 차즈기 소재의 추출물 및 분획물의 유기화학적 분석 및 유효성분의 구조 규명

#### (1) 추출 및 용매분획

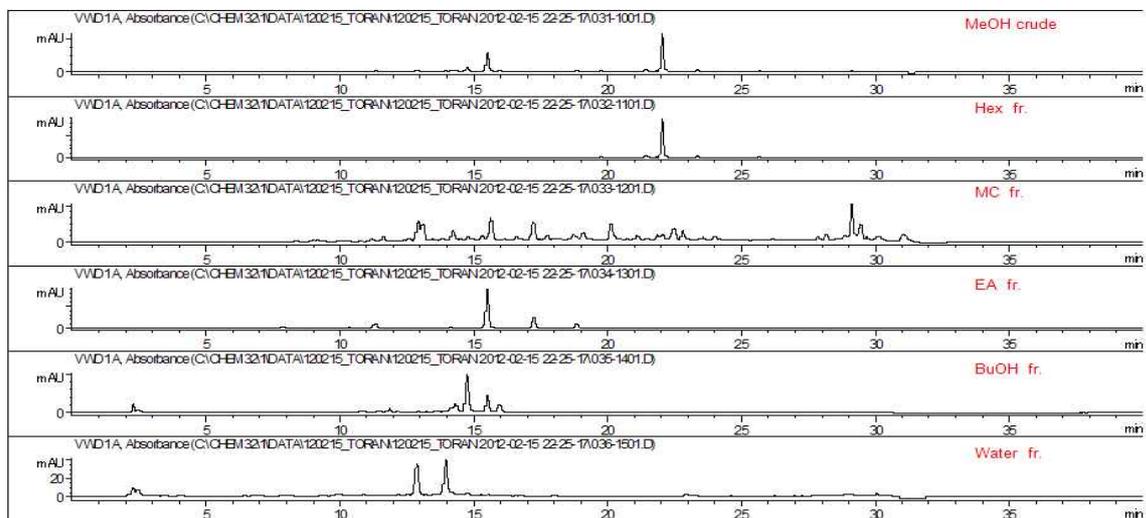
차즈기 2kg을 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 99.5% MeOH (20L)로 3회 반복 reflux 추출하였다. 추출액을 여과한 후에 여액을 회전 감압 농축기를 이용하여 MeOH 추출물을 얻었으며, MeOH 추출물을 물로 현탁시키고, 극성에 따라 n-Hexane, Methylene chloride, Ethyl acetate, n-Butanol 그리고 H<sub>2</sub>O층으로 순차적으로 분획을 실시하고 얻은 각 분획물들은 감압 농축한 후 동결건조를 실시하여 n-Hexane layer 40g, Methylene chloride layer 25g, Ethyl acetate layer 22g, n-Butanol layer 116g, H<sub>2</sub>O layer 27g 얻었다.

#### (1-1) 박층크로마토그램(Thin Layer Chromatography, TLC)를 이용한 성분 분석

**Fig. 1:** 용매별 분획물을 TLC를 이용하여 물질분포를 확인하였다. 용매별 분획물 성분 분석은 각 시료 10mg을 Methanol에 용해한 후, TLC 점적기 (Automatic TLC Sampler, ATS4)를 이용하여 각 시료당 10ul씩 점적 및 건조시켰다. 이 후에 CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 75: 2(v/v) 용매로 전개시킨 후, UV (254, 366 nm)로 관찰하고 10% sulfuric acid를 각각 분무 후, 100°C에서 건조시켜 band를 확인하였다.



#### (1-2) HPLC를 이용한 용매별 분획 물질분포 분석



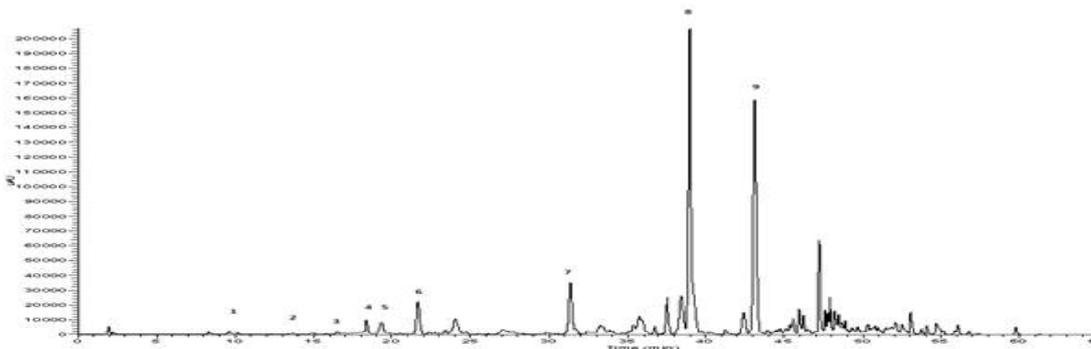
**Fig. 2:** 분석 칼럼은 Agilent Eclips XDB-C18 (5  $\mu$ m, 4.6 \* 250 mm i.d.), flow rate 0.7 mL/min, 이동상 water (A)와 Methanol (B)을 사용하여 0분 A:B=95:5 3분 A:B=64:36 13분 A:B=60:40 22분 A:B=0:100 24분 A:B=0:100 26분 A:B=95:5 34분 A:B=95:5 로 분석하고 UV 254 nm 에서 검출하여 peak를 확인하였다.

(2) n-Hexane분획물로부터 유효성분 도출 및 구조 규명

(2-1) n-Hexane 분획물의 MS분석

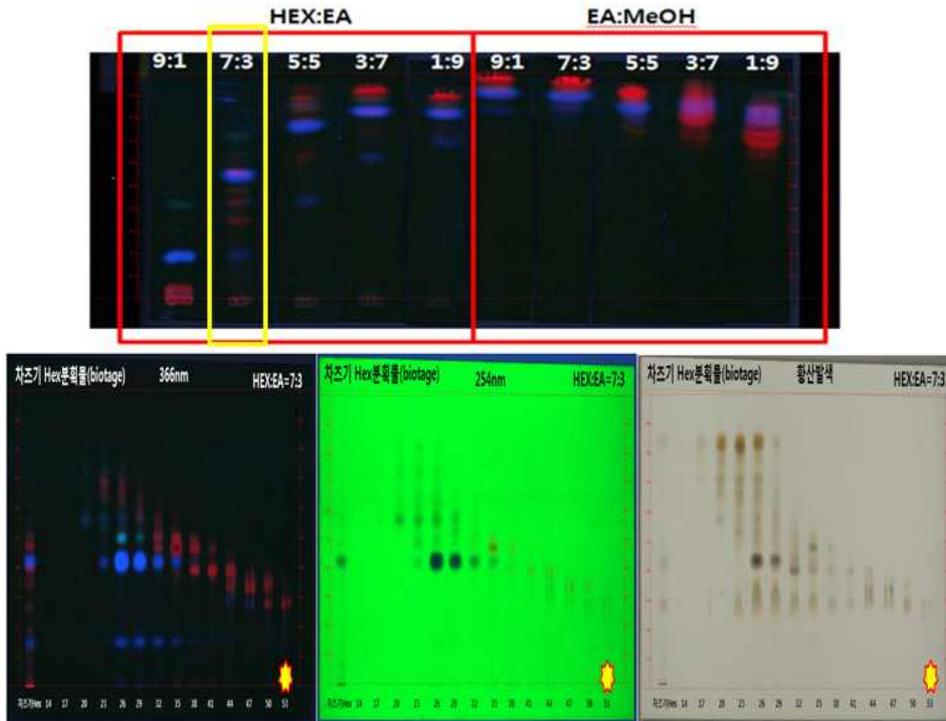
**Table 1:** n-Hexane 분획물의 MS분석

Peak	tR(min)	$\lambda_{max}$ (nm)	MW	MS ( $m/z$ )	MS <sub>2</sub> ions ( $m/z$ )
1	9.63	258,279			
2	13.67	267,301		652	635(100),528(8)
3	16.51	251,279		828	811(100),459(40)
4	18.40	250,329			
5	19.35	241.291		225	193(100),209(10)
6	21.65	241,277,343		197	169(100),154(20)
7	31.36	228,262		195	163(100),167(40),134(25)
8	36.96	228,256,313		209	194(100),181(85),177(25)
9	43.10	230,272		463	359(100),301(95),131(85)



**Fig. 3:** n-Hexane 분획물의 성분을 규명하기 위하여 Finnigan Surveyor HPLC system을 이용하여 역상 Eclipse XDB - C18 칼럼 (4.6×150 mm I.D., 5  $\mu$ m)을 사용하였다. 사용된 이동상은 0.1% trifluoroacetic acid (A)와 acetonitrile (B)를 다음과 같은 용매 기울기로 분석하였다. 7.5% B; 0 min, 55% B; 40 min, 100% B; 50 min, 100% B; 60 min.

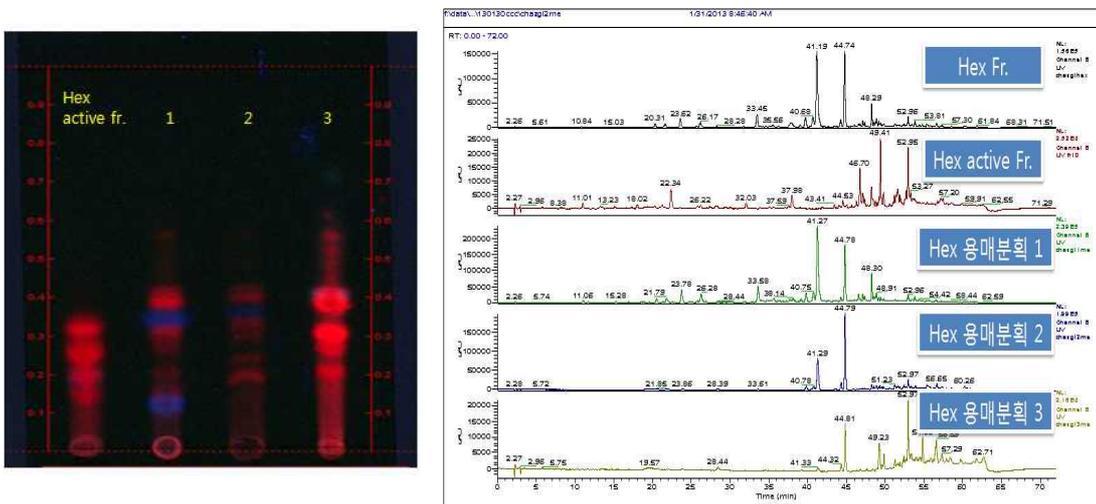
(2-2) Biotage를 이용한 n-Hexane 분획물 분석



**Fig. 4:** TLC를 이용하여 366nm에서 측정된 결과 Hex:EA 조건에서 7:3이 분리가 잘됨을 확인할 수 있었으며, 다른 분리조건에서는 한꺼번에 몰려나오는 현상을 확인하였다. 실험은 SiliaSep™ Flash Cartridges 컬럼을 사용하였으며, 용매는 Hexane:EA=7:3으로 준비하여 유속 5 ml/min로 흘려, 120분 실시하였다.

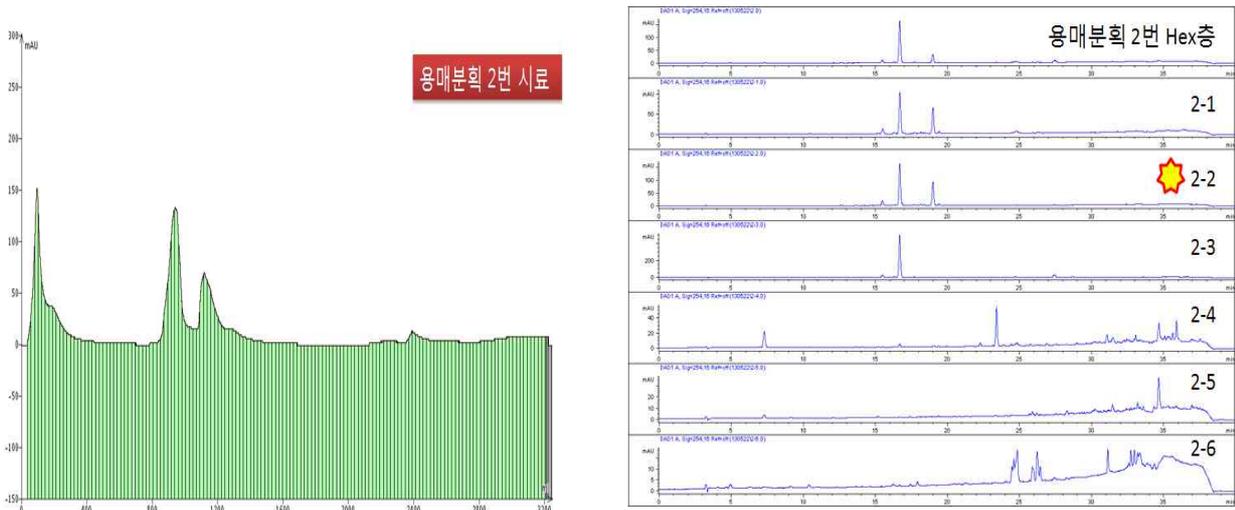
분리결과-53번에서 콜레스테롤 저하에 강한 활성을 보였으며, 그룹을 나눠 총 10개의 그룹 중 **53번이 강한 활성을 보였다.** TLC 패턴에서 하층에 위치된 것으로 보아 극성의 물질임을 확인하였고, 총 26개의 용매 분획조건을 이용하여 하층과 상층을 분리해 활성이 있는 하층만을 분리하기 위해 용매조건을 확보하여 분리를 실시하였다.

(2-3) n-Hexane 분획물 용액분획법



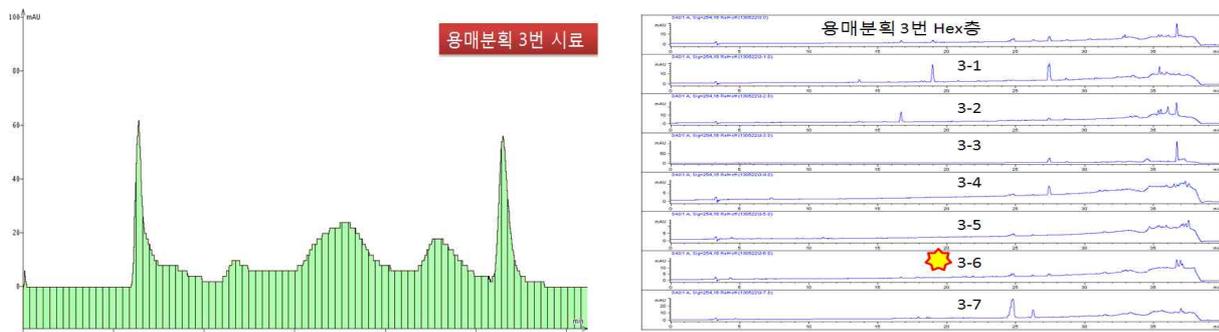
**Fig. 5:** 활성 분획물 (53번)을 용이하게 분리하기 위하여 용매 분획을 실시하였다. 조건 1번과 2번 (1: Heptane:EA:MeOH:Water=6:4:6:4, 2: Hex:EA:MeOH:Water= 8.3:1.7:8.3:1.7)을 이용하였으며, 조건 1번 후 하층을 (1), 상층을 따로 농축한 후 2번 용매조건을 실시하고 상층을 (3), 하층을 (2)로 TLC와 HPLC로 나눠짐을 확인하였다. 따라서 2, 3번 모두 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

(2-4) n-Hexane 용매분획 2번 분획물 분리 분석



**Fig. 6:** 용매분획을 통해 얻어진 2번 시료는 biotage로 결과 분석하였다. TLC를 이용하여 총 6개의 그룹을 만들어 활성을 측정하였다. 용매분획 2번 biotage 분리 결과 2-2에서 활성을 보였으며, 비교적 단순로운 패턴을 보여 분리를 통하여 단일 compound를 용이하게 얻을 수 있을 거라 예상할 수 있다.

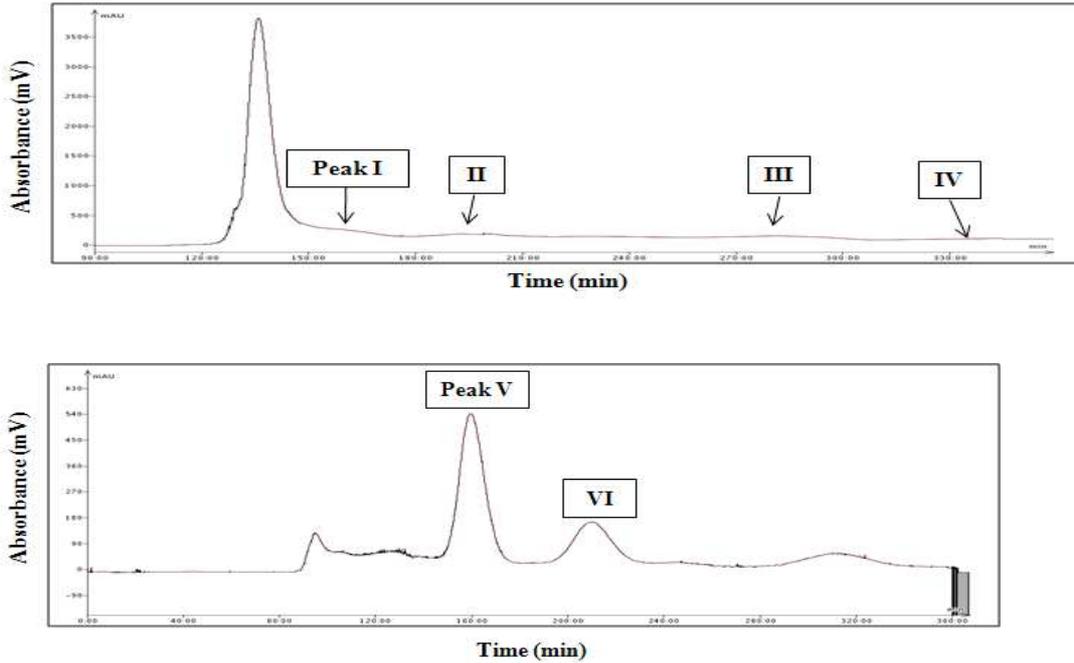
(2-5) n-Hexane 용매분획 3번 분획물 분리 분석



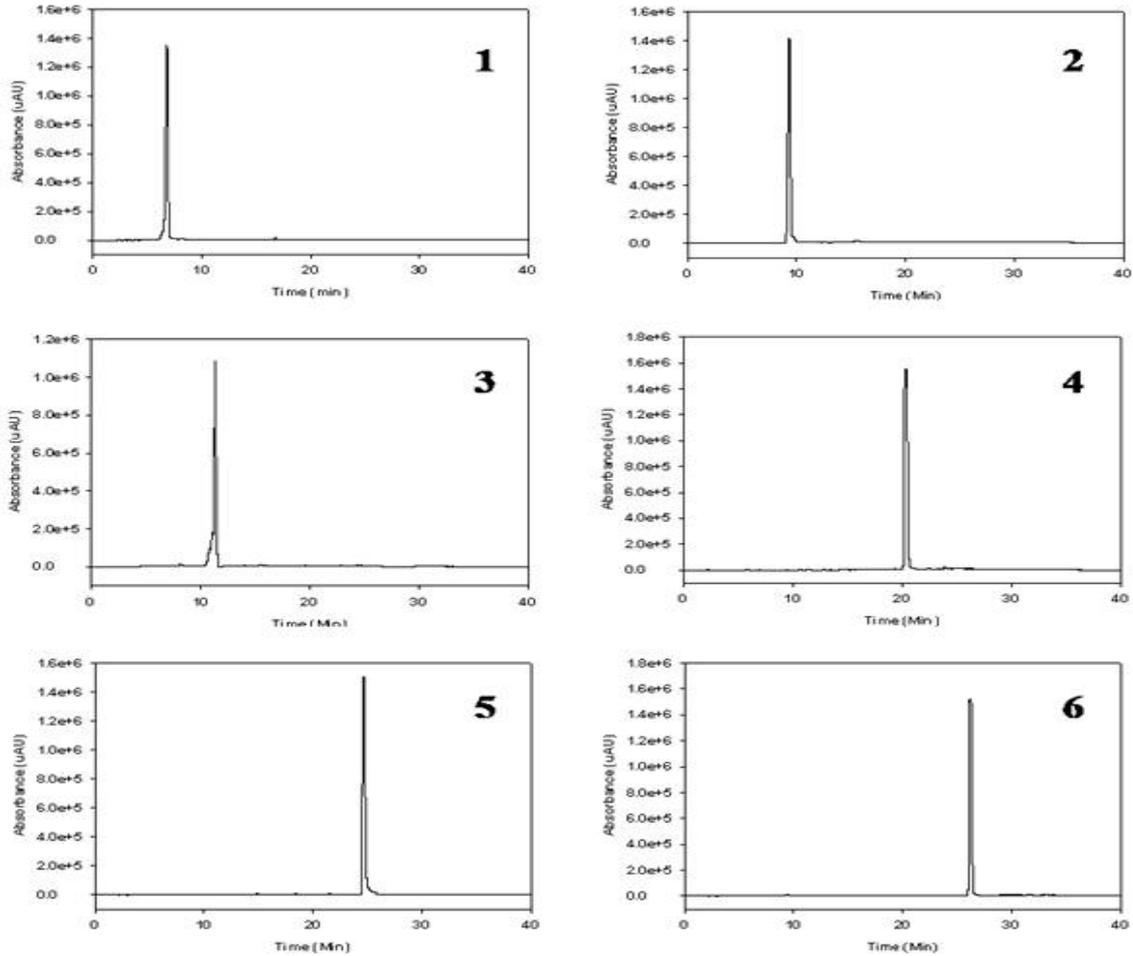
**Fig. 7:** 용매분획을 통해 얻어진 3번 시료는 biotage를 통해 결과 분석하였다. TLC를 이용하여 총 7개의 그룹을 만들어 활성을 측정하였는데, 용매분획 3번 biotage 분리 결과 3-6에서 활성을 보였다. 그러나 비교적 복잡한 패턴을 보여, 많은 양을 확보 후 분리를 해야 적절한 양을 확보할 수 있다고 사료된다.

(3) Ethyl acetate분획물로부터 유효성분 도출 및 구조 규명

(3-1) 고속역류크로마토그래피(HSCCC)를 이용한 차즈기 Ethyl acetate 분획물의 분리과 정제



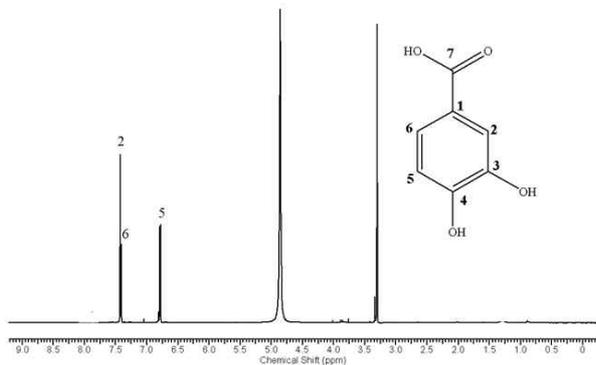
**Fig. 8:** 이동상의 유속을 10 mL/min으로 셋팅하고 UV detector의 분석파장을 280 nm로 맞추었다. Solvent system은 다양한 형태의 혼합물 중에서 HEMW (hexane-ethyl acetate-methanol-water)을 1.5:5:1:5 그리고 3:7:5:5로 선택하였다. 고정상 solvent을 상층, 이동상 solvent을 하층을 사용하였다. 고정상의 유속을 10 mL/min으로 하여 column의 내부를 채우고, HSCCC Figure Spectrum (column volume: 1000 mL)의 조건은 400 rpm으로 작동 시킨 후, 이동상의 유속을 5 mL/min 흘려준다. 시료 4g을 이동상과 고정상 용매(25 ml/25 ml) 총 50 mL에 녹여 sample loop에 주입하였다.



**Fig. 9:** Fig 3-1에서 분리된 1-6까지의 물질을 HPLC를 통해 확인한 결과이다. HPLC 조건은 column: Eclipse SB C18 Rapid Resolution column(150 × 4.6 mm, 5 μm, Agilent); column temperature, 30°C; mobile phase, 0.1% TFA (solvent A) and acetonitrile (solvent B); HPLC analysis, 0 - 7 min, linear gradient from 7.5-55% B (0 - 40 min). Flow rate, 0.7 mL/min; detection, photodiode array detector; injection volume, 10 μl 이며, 각 피크는 90% 이상의 순도를 나타낸다.

### 3-3. Ethyl acetate분획물 성분의 분리 및 구조규명

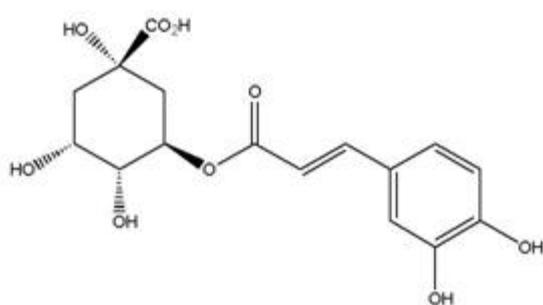
Compound 1 (protocatechuic acid, 24.9mg), compound 2 (chlorogenic acid, 50.1mg), compound 3 (caffeic acid, 9.1mg), compound 4 (rosmarinic acid, 549.1mg), compound 5 (luteolin, 81.4mg), compound 6 (methyl rosmarinic acid, 56.9mg)을 얻었으며, 분리된 화합물은 <sup>1</sup>H- 및 <sup>13</sup>C-NMR, MS 데이터를 통하여 구조를 규명하였다. 아래부터 순서대로 compound 1부터 6까지 열거하였다.



**Fig. 10:**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of **compound 1** (Protocatechuic acid)

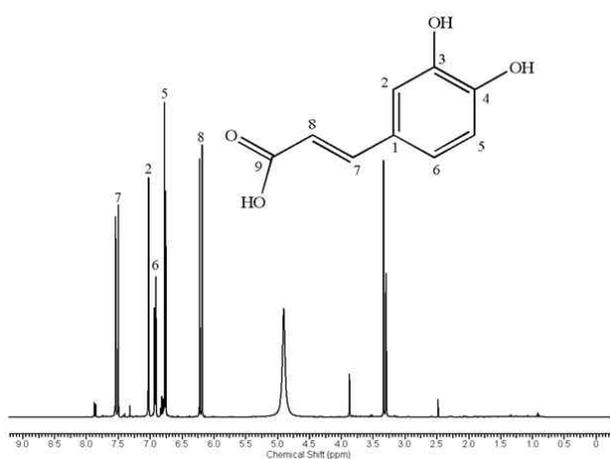
**Compound 1:**  $^1\text{H}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  6.79 (1H, d,  $J=8.0$  Hz),  $\delta$  7.42 (1H, dd,  $J=8.0$  Hz and  $J=2.0$  Hz),  $\delta$  7.43 (1H, d,  $J=2.0$  Hz);  $^{13}\text{C}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  168.15 (C-7), 115.99 (C-2), 117.38 (C-5), 122.47 (C-6), 122.47 (C-1), 145.73 (C-3), 150.85 (C-4); RT (retention time) 5.66min, ESI-MS ( $m/z$ ) 155 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>,

MS-MS ( $m/z$ ) 109 [ $\text{M}-\text{COOH}$ ]<sup>+</sup>; UV (MeCN,  $\lambda_{\text{max}}$  nm) 259sh, 294.



**Fig. 11:** compound 2(chlorogenic acid)

**Compound 2:** RT (retention time) 8.6 min, ESI-MS ( $m/z$ ) 353 ( $\text{M}-\text{H}$ )<sup>-</sup>, 191 [quinic acid- $\text{H}$ ]<sup>-</sup>, 179 [caffeic acid- $\text{H}$ ]<sup>-</sup>; UV (MeCN,  $\lambda_{\text{max}}$  nm) 298sh, 346 (max).



**Compound 3:**  $^1\text{H}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  6.77 (1H, d,  $J=8.1$  Hz, H-5),  $\delta$  7.03 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-2),  $\delta$  6.93 (1H, dd,  $J=8.1$  Hz and  $J=2.0$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  171.46 (C-9), 115.96 (C-8), 147.22 (C-7), 116.91 (C-5), 115.51 (C-2), 123.27 (C-6), 128.23 (C-1), 147.45 (C-3), 149.87 (C-4); RT(retention time) 9.54 min, ESI-MS ( $m/z$ ) 181 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, MS-MS ( $m/z$ ) 135 [ $\text{M}-\text{COOH}$ ]<sup>+</sup>; UV (MeCN,  $\lambda_{\text{max}}$  nm) 235sh, 323.

**Fig. 12:**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (Left) and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (Right) of **compound 3** (Caffeic acid)

**Compound 4:**  $^1\text{H}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)  $\delta$  6.61 (dd,  $J=1.9$  Hz and  $J=8.0$  Hz),  $\delta$  6.69 (d,  $J=8.0$  Hz),  $\delta$  6.75 (d,  $J=1.9$  Hz),  $\delta$  6.77 (d,  $J=8.1$  Hz),  $\delta$  6.94 (dd,  $J=8.1$  Hz and  $J=1.9$  Hz),  $\delta$  7.04 (d,  $J=1.9$  Hz),  $\delta$  7.54 (d,  $J=15.9$  Hz),  $\delta$  6.26 (d,  $J=15.9$  Hz),  $\delta$  5.19 (dd,  $J=4.3$  Hz and  $J=8.2$  Hz),  $\delta$  3.00 (dd,  $J=8.2$  Hz and  $J=14.2$  Hz),  $\delta$  3.09 (dd,  $J=4.3$  Hz and  $J=14.2$  Hz);  $^{13}\text{C}$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz)  $\delta$  147.22 (C-4'), 150.15 (C-3'), 146.57 (C-3), 145.69(C-4), 173.97 (C-9), 168.90 (C-9'), 148.16 (C-7'), 116.73 (C-8'), 75.06 (C-8); RT(retention time) 17.95 min, ESI-MS ( $m/z$ ) 361 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, MS-MS ( $m/z$ ) 163 [ $\text{M}-\text{COOH}$ ]<sup>+</sup>; UV (MeCN,  $\lambda_{\text{max}}$  nm) 244,335 (max).

**Fig. 13:**  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (left) and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (Right) of **compound 4** (Rosmarinic acid)



(4) Water분획물로부터 유효성분 도출 및 구조 규명

(4-1) Water분획물의 MS분석

Table 2: Water 분획물의 MS분석

Peak	$t_R$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	MW	MS( $m/z$ )	MS <sub>2</sub> ions( $m/z$ )	Compound
1	4.61	222,280				
2	7.79	285				
3	9.54	235,314				
4	11.09	253,346		639	287(100),463(50)	Luteolin 7-O-glucoside
5	12.93	231,267,336		623	271(100),446(50)	Apigenin 7-O-diglucuronide
6	14.48	270,336		652	635(100),546(10)	
7	16.34	233,282		738	522(100)	

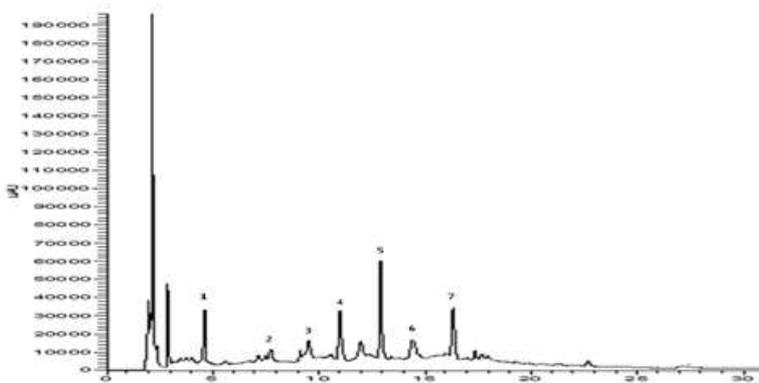
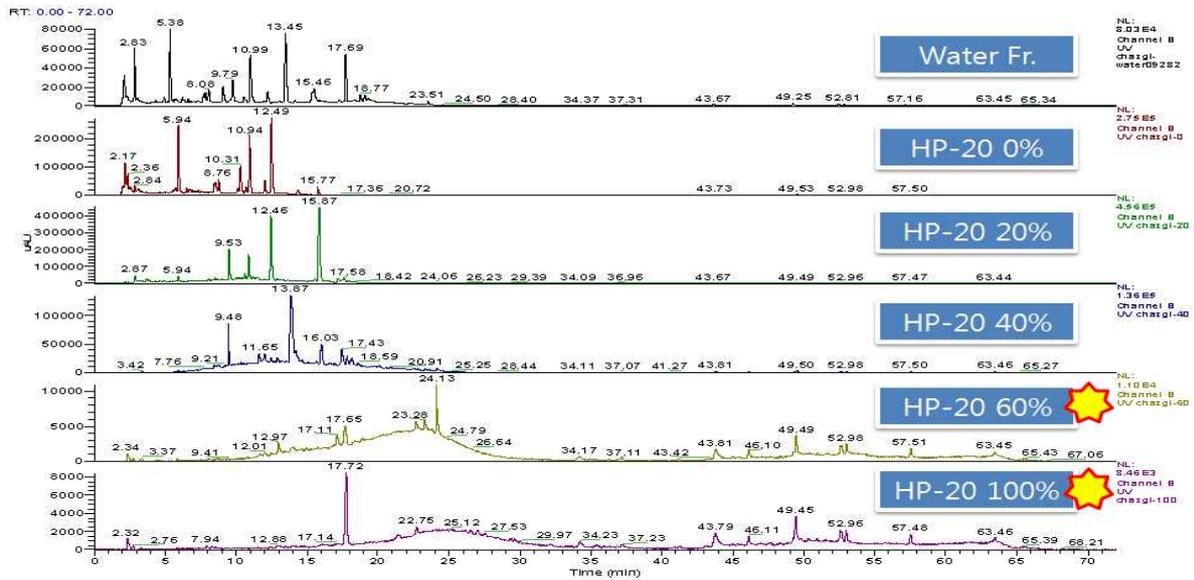


Fig. 16: Water분획물의 성분을 규명하기 위하여 Finnigan Surveyor HPLC system을 이용하여 역상 Eclipse XDB - C18 칼럼 (4.6×150 mm I.D., 5 μm)을 사용하였다. 사용된 이동상은 0.1% trifluoroacetic acid (A)와 acetonitrile (B)를 다음과 같은 용매 기울기로 분석하였다. 7.5% B; 0 min, 55% B; 40 min, 100% B; 50 min, 100% B; 60 min.

또한 4번과 5번은 MS를 통해 알 수 있었으며, 대부분 당과 결합된 상태의 고분자 및 극성물질로 이루어져있음을 확인하였다.

(4-2) Diaion HP-20(다공성 충전제)을 이용한 분리

Fig. 17: HP-20은 추출물이 흡착제를 통하게 하여 극성이 낮은 물질 (지용성 물질)을 흡착시킨 후 증류수를 가해 흡착제에 흡착되지 않은 물질(수용성물질)을 제거하고, 적당한 유기용매(MeOH, Acetone)를 사용하여 흡착물질을 용출시키는 분리방법이다. HP-20을 통해 분리한 결과, 각 MeOH 퍼센트 별로 5개의 fraction을 얻었으며(0, 20, 40, 60, 100 %), 활성측정 결과 60 %와 100 %가 효과를 보였다.



(5) 원료의 구성성분 Pattern 분석 : 활성 분획물(Hexane 분획물)

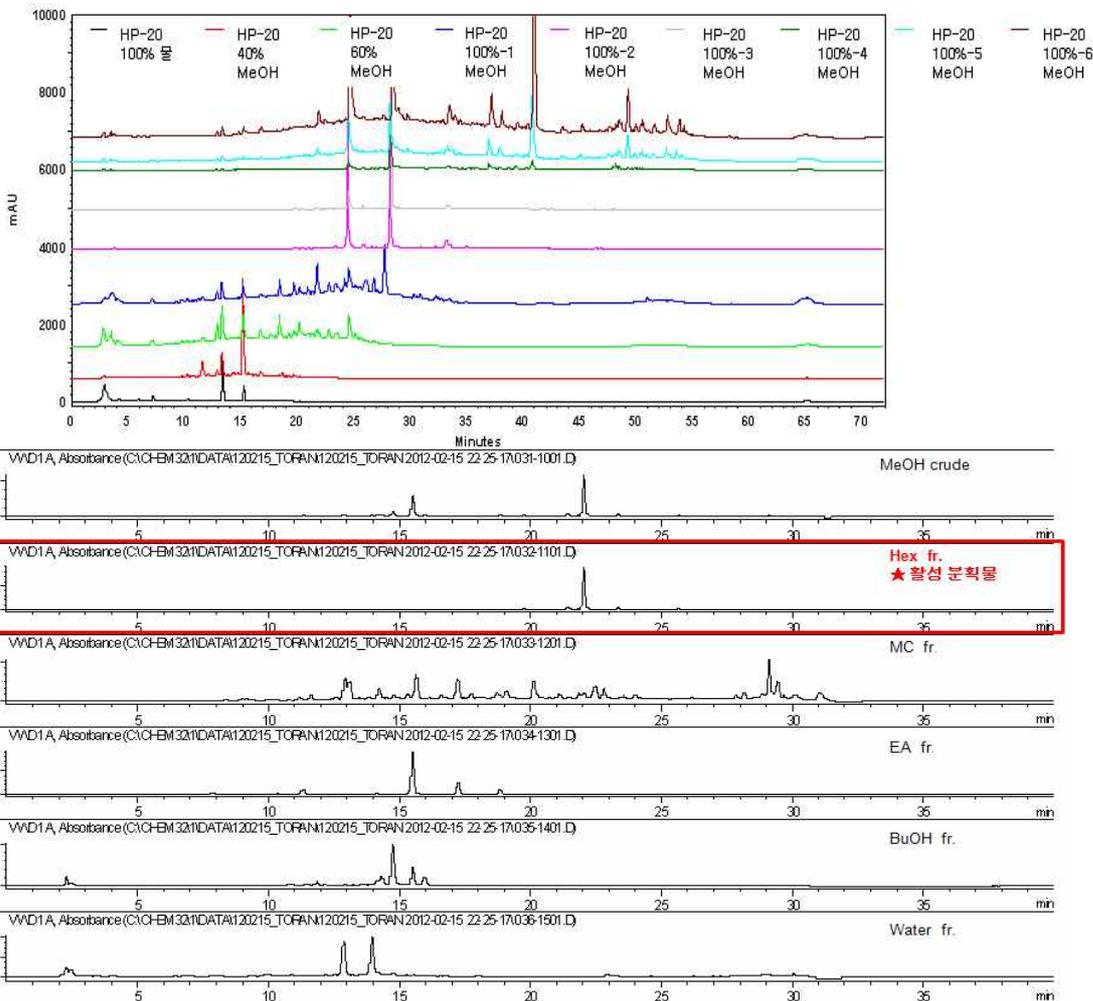


Fig. 18: 분석 칼럼은 Agilent Eclipse XDB-C18 (5  $\mu$ m, 4.6 \* 250 mm i.d.), flow rate 0.7 mL/min, 이동상 water (A)와 Methanol (B)을 사용하여 0분 A:B=95:5 3분 A:B=64:36 13분 A:B=60:40 22분 A:B=0:100 24분 A:B=0:100 26분 A:B=95:5 34분 A:B=95:5 로 분석하고 UV

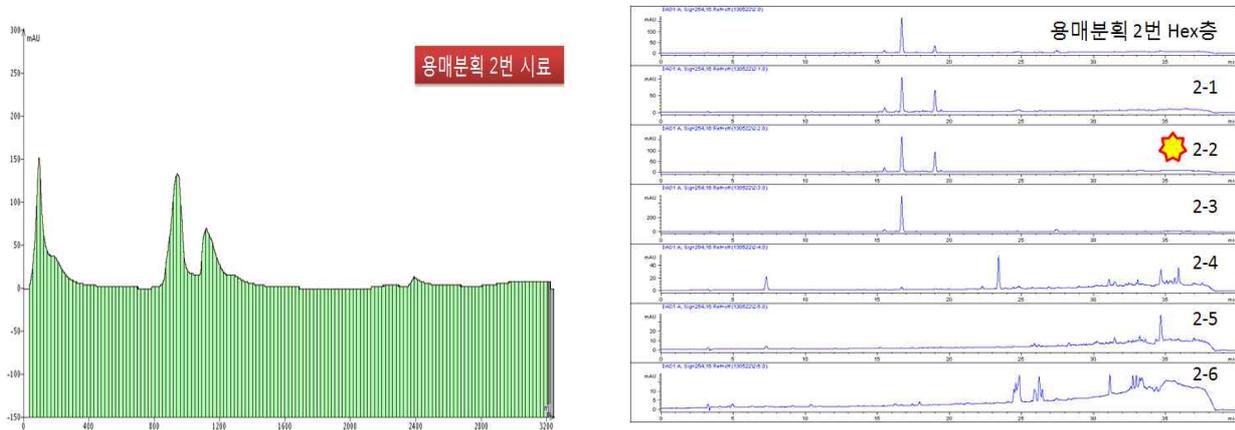
254 nm 에서 검출하여 peak를 확인하였다. 산화 LDL로 유도된 거품세포의 형성을 감소시키는 Hexane분획물의 패턴 확인하였더니, 비교적 단조로운 패턴으로 확인되었다.

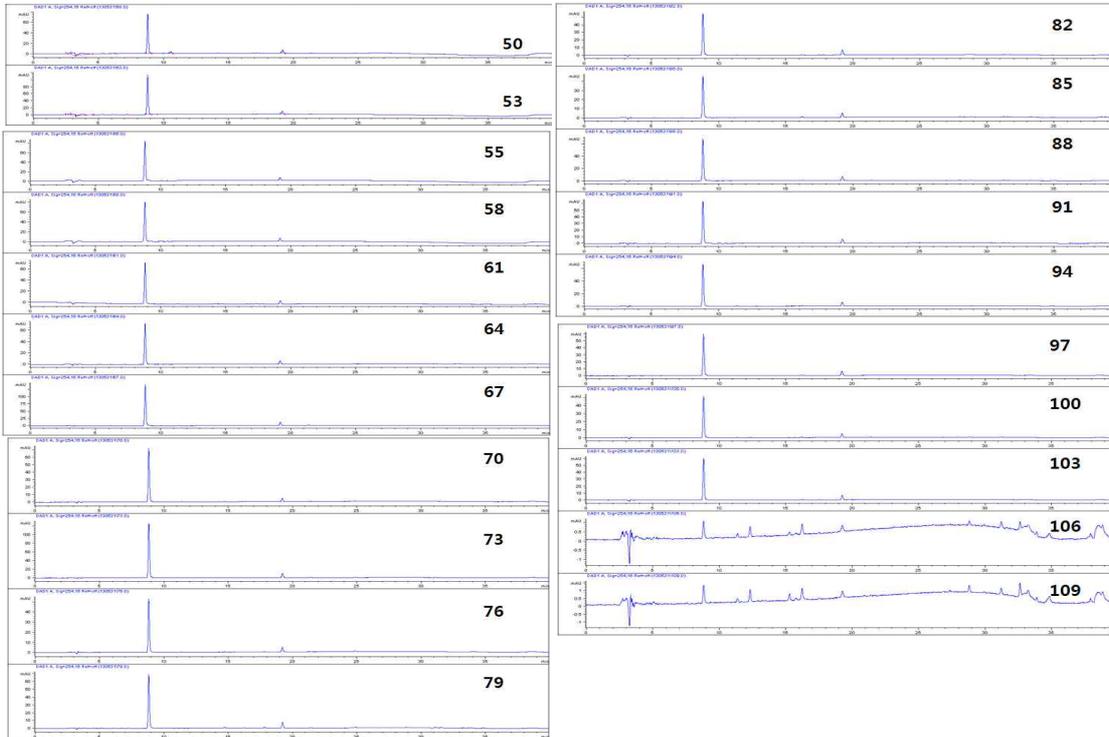
**(6) 활성 분획물로부터 유효성분 도출 및 구조 동정을 통한 구조 규명**

n-Hexane 분획물을 Biotage를 이용하여 분리한 단일 화합물에 대한 유효성분을 도출하였으며 NMR(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR, COSY, DEPT, HMQC 및 HMBC) 기기를 사용하여 활성성분의 정확한 구조 동정을 통하여 화합물의 구조를 규명하였다.

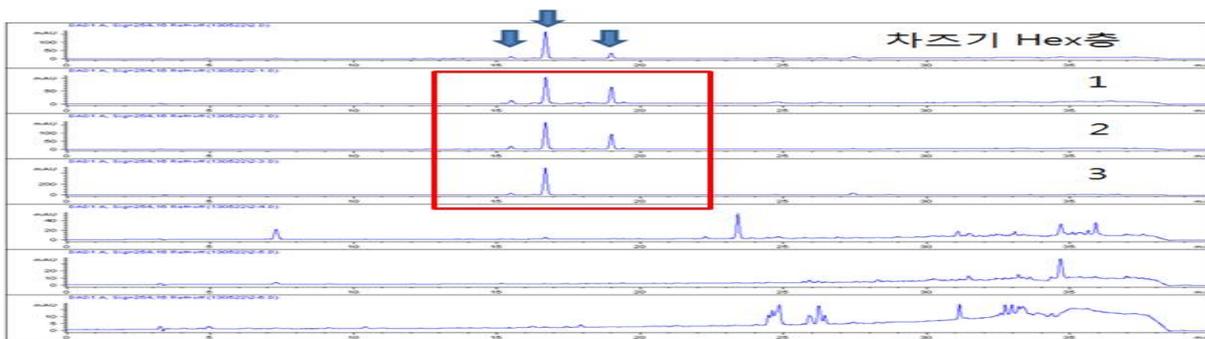
**① n-Hexane 분획물 분리(biotage 결과)**

**Fig. 19:** 1차년도에서 n-Hexane 분획물 2번 biotage 분리결과에서 2-2에서 활성을 보였고 비교적 단조로운 패턴을 보였기 때문에 Silica gel을 이용하여 분리를 진행하였다.





**Fig. 20:** Silica의 양은 25 g을 충전하고, 시료의 양은 800 mg을 loading 하였고, 전개용매는 Ethyl acetate, n-Hexane을 사용하였다. fraction collector를 이용하여 총 180개의 test tube를 받았고 전개용매는 1-32번은 0% EA, 33-45번은 3% EA, 46-82번은 5% EA, 83-180번은 7-100% EA로 흘려주었다. 50번에서 103번에서 단조로운 peak를 얻었으며 이 180개의 test tube를 8개의 그룹으로 나누어 분석하였다.

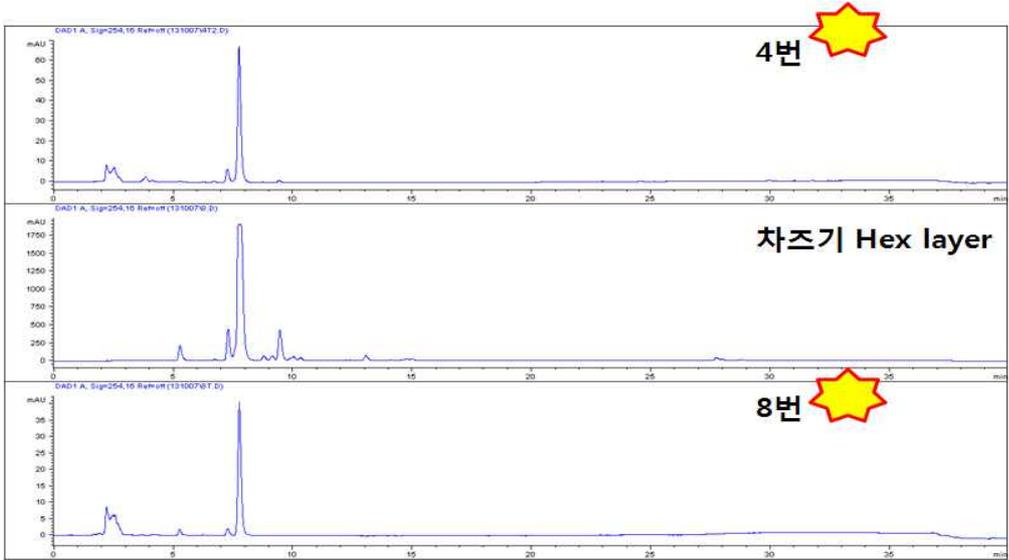


**Fig. 21:** 8개의 그룹을 가지고 활성 측정결과 1, 2, 3번에서 활성을 보였다.

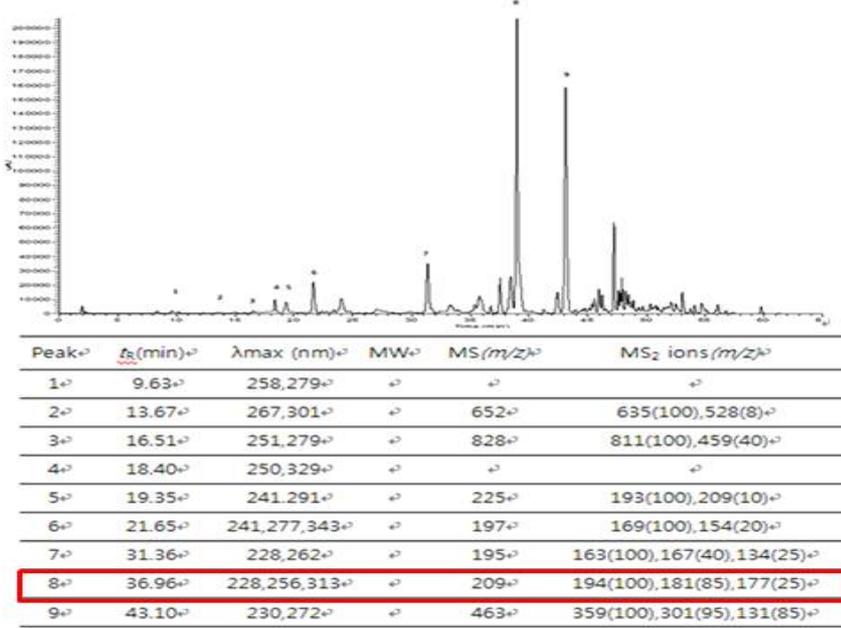
**Fig. 22:** 활성을 보인 부분을 재분리 하였더니 4번과 8번에서 Active peak를 찾을 수 있었다. 이 peak를 이용하여 NMR( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, COSY, DEPT, HMQC 및 HMBC)기기를 사용하여 동정하였다.

## ② n-Hexane을 이용하여 분리한 단일 화합물 구조 규명

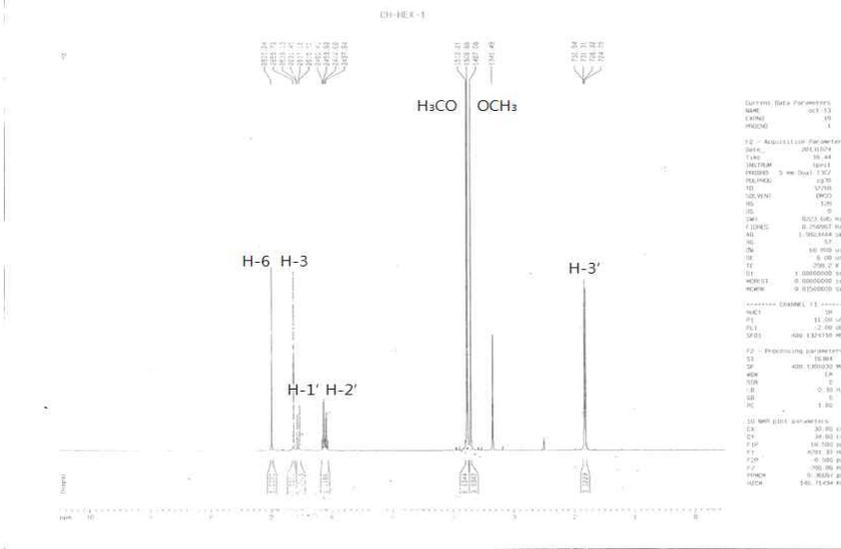
**Fig. 23:** 분리한 화합물은 황색의 oil상으로 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -anisaldehyde에서 보라색으로 발색되며, 비선광도 값은  $-14.00^\circ$  (c 1.85,  $\text{CHCl}_3$ )으로 나타났다. 아래 그림에서 FAB-MS



spectrum 에서 molecular ion peak가 209[M]<sup>+</sup>로 관찰 되었으며, <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR data와 종합하여 molecular formula를 C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>로 추정하였고, 이것으로부터 불포화도(IHD)를 5로 예측하였다.



**Fig. 24: <sup>1</sup>H-NMR spectrum of asarone**  
<sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 3.74 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.79 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.79 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>)를 통해 methoxy peak를 관찰 할 수 있고, δ 5.76 (1H, dq, J = 10.6, 6.8 Hz, H-2'), 6.47 (1H, dq, J = 10.6, 1.8Hz, H-1')에서 olefinic proton signal을 관찰 할 수 있으며, δ 6.53 (1H, s, H-3), 6.84 (1H, s, H-6)에서 aromatic proton signal이 관찰 할 수 있으며, 또한 H-3'의 integral값이 3H에 해당하는 값을 나타내며, 통상적으로 C=C에서 H이 cis(β)의 경우 J값이 6~12Hz 정도에 나타나며 Trans(α)의 경우 J값이 12~18Hz에서 나타나는 것을 확인 할 수 있다. 확보한 <sup>1</sup>H-NMR data의 H-1'과 H-2'의 J값을



계산한 결과 각각 6.58 (<sup>1</sup>H, J=16.6, 1.8Hz ), 6.12 (<sup>1</sup>H, J=15.8, 6.6Hz )으로 계산이 되며 이

정보를 통해 분리 정제한 화합물은 trans(a) 형태의 화합물임을 알 수 있었다.

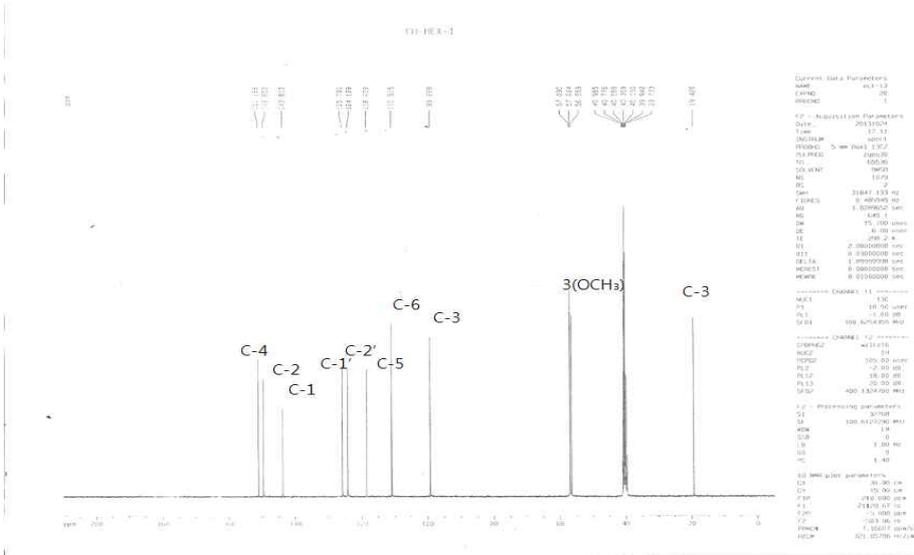


Fig. 25:  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of asarone

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  56.3 ( $-\text{OCH}_3$ ), 56.5 ( $-\text{OCH}_3$ ), 56.7 ( $-\text{OCH}_3$ )를 통해 methoxy carbon peak를 관찰 할 수 있었고,  $\delta$  197.9

(C-3), 114.5 (C-6), 118.4 (C-5), 142.7 (C-1), 148.9 (C-2), 151.8 (C-4)에서 aromatic carbon signal이 관찰되었다. 이 외에도 2D-NMR(COSY, HMBC, HMQC)등의 자료들을 통해 각각의 부분구조와 결합 형태를 확인 하였다.

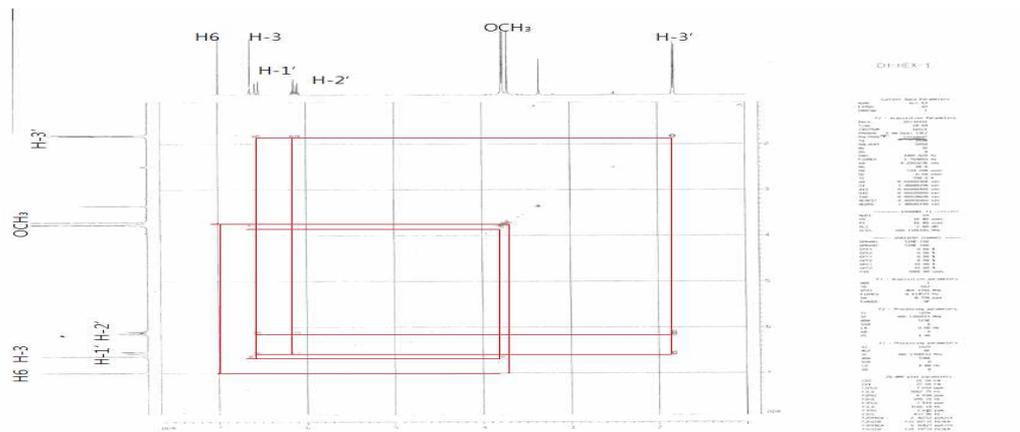


Fig. 26: COSY spectrum of asarone

Fig. 27: HMBC spectrum of asarone

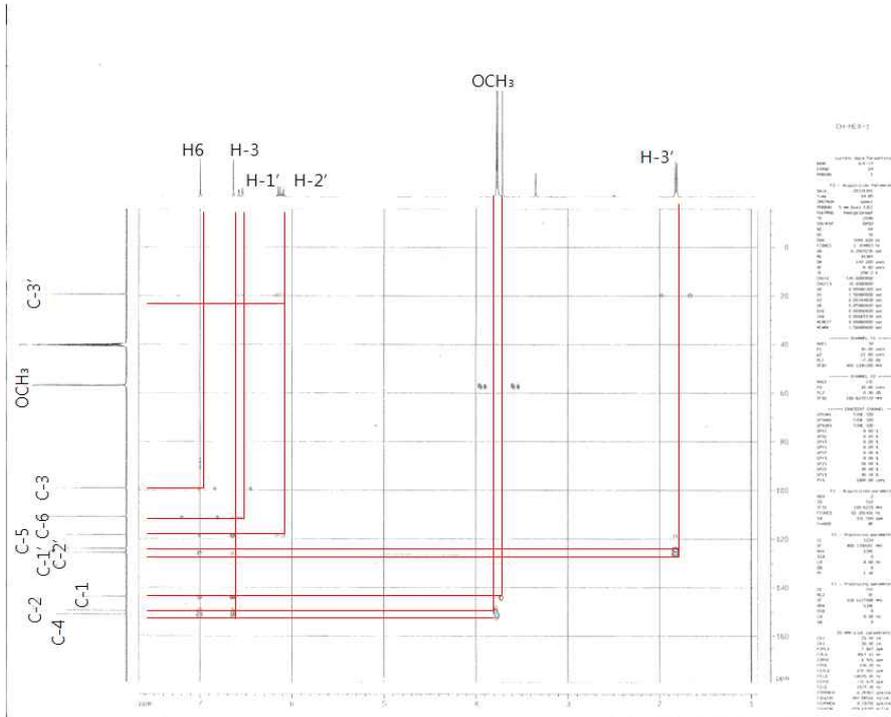
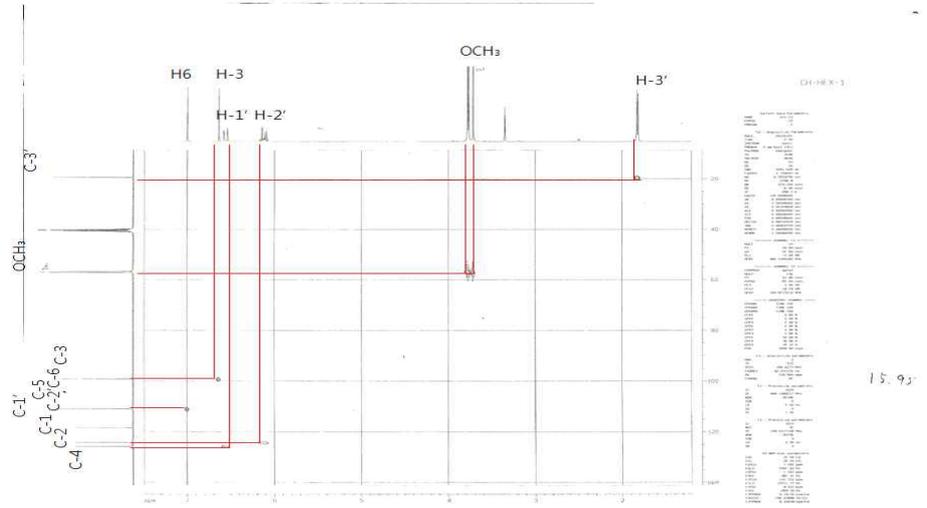


Fig. 28: HMQC spectrum of asarone

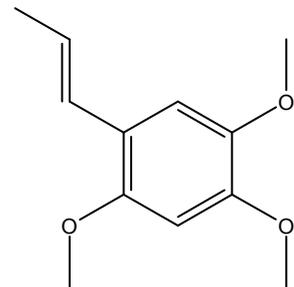
spectrum of asarone



$C_{12}H_{16}O_3$  (M.W. 208)

Yellow oil, 10%  $H_2SO_4$ -anisaldehyde 발색 : 보라색

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 1.8 (3H, dd,  $J = 7.0, 1.8$  Hz, H-3'), 3.74 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.79 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.83 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 5.76 (1H, dq,  $J = 10.6, 6.8$  Hz, H-2'), 6.47 (1H, dq,  $J = 10.6, 1.8$  Hz, H-1'), 3.53 (1H, s, H-3), 6.84 (1H, s, H-6);  $^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 14.9 (C-3'), 56.3 (-OCH<sub>3</sub>), 56.5 (-OCH<sub>3</sub>), 56.7 (-OCH<sub>3</sub>), 97.9 (C-3), 114.5 (C-6), 118.4 (C-5), 124.5 (C-2'), 125.3 (C-1'), 142.7 (C-1), 148.9 (C-2), 151.8 (C-4)



<Asarone>

Fig. 29: Structure of asarone from *Perilla frutescens* Britton ver.

**(7) 활성 추출분획물의 대량 추출법 확립**

차즈기 Hex층에서 분리한 Asarone의 대량 추출법을 확립하기 위하여 추출 방법인 Sonication, 침출, reflux를 각 17가지로 조건을 나누었다. 총 51가지 조건으로 추출 후 결과를 분석하였다. 분석은 HPLC는 Agilent technology 1100을 사용하였고, 조건으로는 column: Eclipse Plus C<sub>18</sub>(150× 4.6 mm, 5 μm, Agilent); column temperature, 30°C; mobile phase, 0.1% TFA (solvent A) and MeOH (solvent B); HPLC analysis, 0 - 15 min, linear gradient from 5-50%, 16 - 23 min, linear gradient from 50-100%, 24 - 35 min, linear gradient from 100-5% B. Flow rate, 0.7 mL/min; detection, 254nm; injection volume, 10 μl 실시하였다.

**① Sonication 조건과 결과 분석**

**Table 3: Sonication 추출방법 RSM 조건**

sonication	단위	-2	-1	0	+1	+2
X <sub>1</sub>	temp(°C)	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
X <sub>2</sub>	time(hr)	30min	1hr	1hr30min	2hr	2hr30min
X <sub>3</sub>	용매(EtOH%)	50%	70%	80%	90%	100%
용매양100ml 시료양10g	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> temp(°C)	X <sub>2</sub> time(hr)	X <sub>3</sub> 용매(EtOH%)
1	-1	-1	-1	35°C	1hr	70%
2	-1	-1	1	35°C	1hr	90%
3	-1	1	-1	35°C	2hr	70%
4	-1	1	1	35°C	2hr	90%
5	1	-1	-1	45°C	1hr	70%
6	1	-1	1	45°C	1hr	90%
7	1	1	-1	45°C	2hr	70%
8	1	1	1	45°C	2hr	90%
9	-2	0	0	30°C	1hr 30min	80%
10	2	0	0	50°C	1hr 30min	80%
11	0	-2	0	40°C	30min	80%
12	0	2	0	40°C	2hr 30min	80%
13	0	0	-2	40°C	1hr 30min	50%
14	0	0	2	40°C	1hr 30min	100%
15	0	0	0	40°C	1hr 30min	80%
16	0	0	0	40°C	1hr 30min	80%
17	0	0	0	40°C	1hr 30min	80%

중심합성계획에서 독립(조건)변수로 온도 (30~50°C), 추출 시간 (60~150분), 용매 % 비율 (50~100%)을 -2, -1, 0, 1, 2, 5단계로 부호화하여 중심합성계획에 따라 17구간으로 설정하여 배합하였다.

**Fig. 30: Sonication 17개 조건의 HPLC 분석**

중속(반응)변수로서 차즈기 추출물의 활성지표인 asarone area값을 회귀분석에 사용하였다. sonication 17개 조건을 수행한 HPLC 분석 결과이다. 5번 조건(area 2073), 12번 조건(area



1596), 10번 조건(area 1548)순으로 많은 양의 asarone이 추출되었다. 따라서 sonication의 최적의 추출 조건은 5번 조건인 45°C, 1 hr, 70%주정으로 확인되었다.

## ② 침출 조건과 결과 분석

Table 4: 침출 추출방법 RSM 조건

침출	단위	-2	-1	0	+1	+2
X <sub>1</sub>	temp(°C)	25°C	40°C	50°C	60°C	70°C
X <sub>2</sub>	time(hr)	2hr	8hr	24hr	48hr	72hr
X <sub>3</sub>	용매(EtOH%)	50%	70%	80%	90%	100%
용매양100ml 시료양10g	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> temp(°C)	X <sub>2</sub> time(hr)	X <sub>3</sub> 용매(EtOH%)
1	-1	-1	-1	40°C	8hr	70%
2	-1	-1	1	40°C	8hr	90%
3	-1	1	-1	40°C	48hr	70%
4	-1	1	1	40°C	48hr	90%
5	1	-1	-1	60°C	8hr	70%
6	1	-1	1	60°C	8hr	90%
7	1	1	-1	60°C	48hr	70%
8	1	1	1	60°C	48hr	90%
9	-2	0	0	25°C	24hr	80%

10	2	0	0	70℃	24hr	80%
11	0	-2	0	50℃	2hr	80%
12	0	2	0	50℃	72hr	80%
13	0	0	-2	50℃	24hr	50%
14	0	0	2	50℃	24hr	100%
15	0	0	0	50℃	24hr	80%
16	0	0	0	50℃	24hr	80%
17	0	0	0	50℃	24hr	80%

중심합성계획에서 독립(조건)변수로 온도 (25~70℃), 추출 시간 (2~72시간), 용매 % 비율 (50~100%)을 -2, -1, 0, 1, 2, 5단계로 부호화하여 중심합성계획에 따라 17구간으로 설정하여 배합하였다.

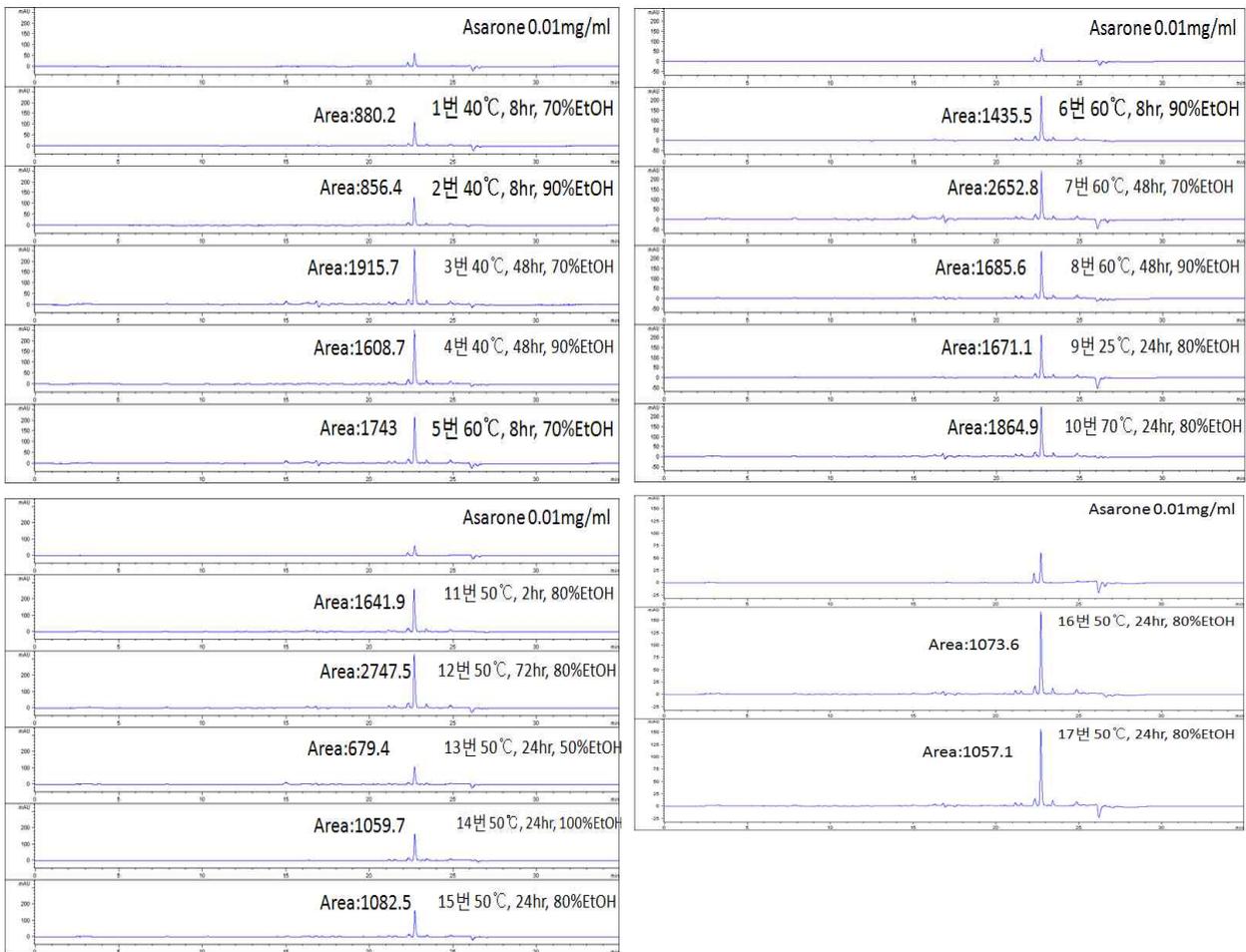


Fig. 31: 침출 17개 조건의 HPLC 분석

종속(반응)변수로서 차즈기 추출물의 활성지표인 asarone area값을 회귀분석에 사용하였다. 침출 17개 조건을 수행한 HPLC 분석 결과이다. 12번 조건(area 2747), 7번 조건(area 2652), 3번 조건(area 1915)순으로 많은 양의 asarone이 추출되었다. 따라서 sonication의 최적의 추출 조건은 12번 조건인 50℃, 72 hr, 80% 주정도로 확인되었다.

### ③ reflux 조건과 결과 분석

Table 5: reflux 추출방법 RSM 조건

reflux (70℃ 고정)	단위	-2	-1	0	+1	+2
X <sub>1</sub>	시료(g)	3g	5g	10g	13g	15g
X <sub>2</sub>	time(hr)	1hr	1hr30min	2hr	2hr30min	3hr
X <sub>3</sub>	용매(EtOH%)	50%	70%	80%	90%	100%
용매양100ml	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> 시료(g)	X <sub>2</sub> time(hr)	X <sub>3</sub> 용매(EtOH%)
1	-1	-1	-1	5g	1hr 30min	70%
2	-1	-1	1	5g	1hr 30min	90%
3	-1	1	-1	5g	2hr 30min	70%
4	-1	1	1	5g	2hr 30min	90%
5	1	-1	-1	13g	1hr 30min	70%
6	1	-1	1	13g	1hr 30min	90%
7	1	1	-1	13g	2hr 30min	70%
8	1	1	1	13g	2hr 30min	90%
9	-2	0	0	3g	2hr	80%
10	2	0	0	15g	2hr	80%
11	0	-2	0	10g	1hr	80%
12	0	2	0	10g	3hr	80%
13	0	0	-2	10g	2hr	50%
14	0	0	2	10g	2hr	100%
15	0	0	0	10g	2hr	80%
16	0	0	0	10g	2hr	80%
17	0	0	0	10g	2hr	80%

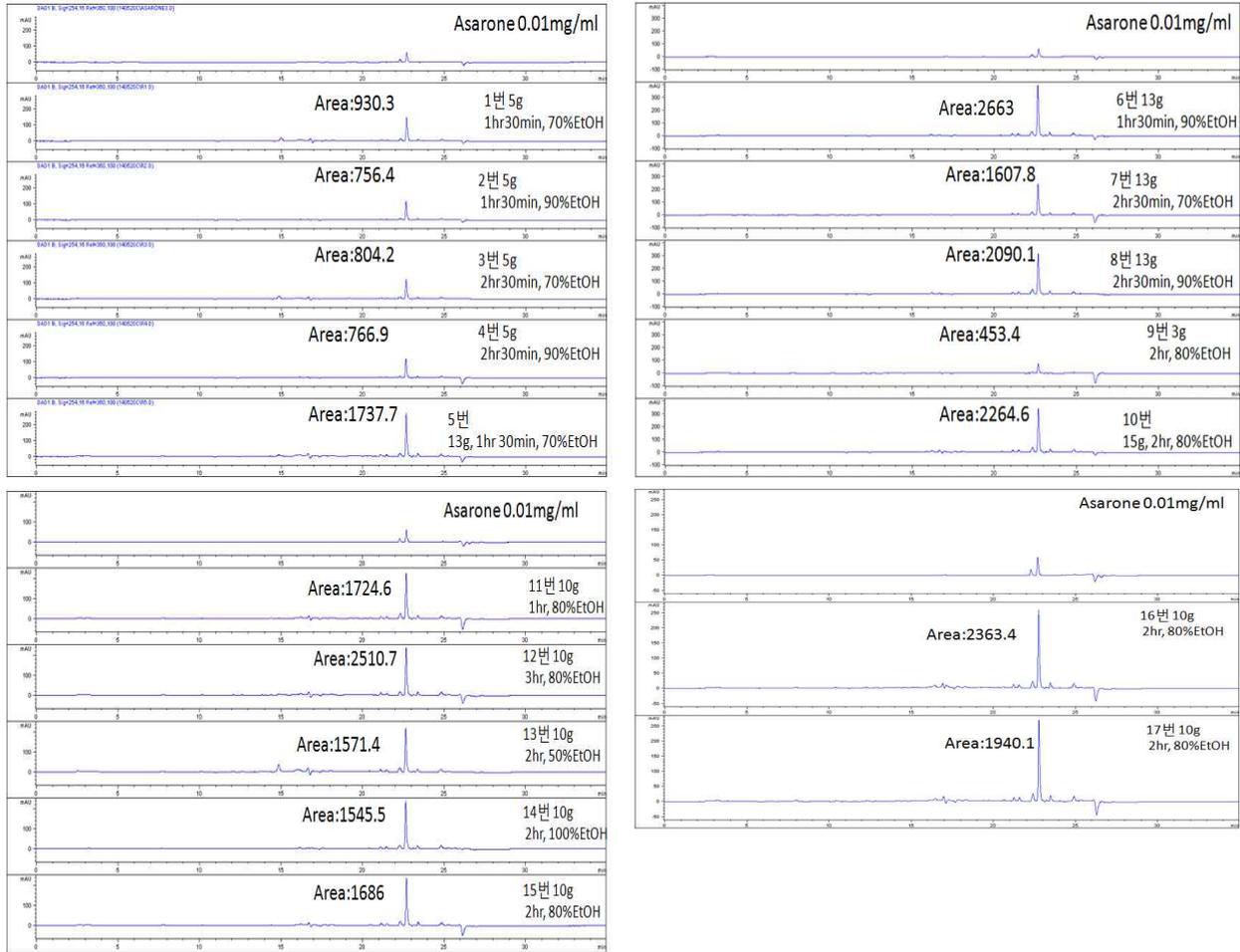
중심합성계획에서 독립(조건)변수로 온도 70℃로 유지, 시료 g (3~15g), 추출 시간 (1~3시간), 용매 % 비율 (50~100%)을 -2, -1, 0, 1, 2, 5단계로 부호화하여 중심합성계획에 따라 17구간으로 설정하여 배합하였다.

#### Fig. 32: reflux 17개 조건의 HPLC 분석

종속(반응)변수로서 차즈기 추출물의 활성지표인 asarone area값을 회귀분석에 사용하였다. reflux 17개 조건을 수행한 HPLC 분석 결과이다. 6번 조건(area 2663), 12번 조건(area 2510), 16번 조건(area 2363)순으로 많은 양의 Asarone이 추출되었다. 따라서 Sonication의 최적의 추출 조건은 6번 조건인 13g, 1 hr 30min, 90% 주정으로 확인되었다.

#### ④ 반응표면분석을 통한 차즈기의 최적 배합에 관한 다항식

회귀분석에 의한 최적조건의 예측은 Statistical Analysis System(SAS version 9.1) program을 이용하였고, 각 실험조건별 4차원 반응표면을 그리기 위해 6시그마 프로그램을 사용하였다. 차즈기 추출물의 활성지표인 Asarone의 최대 추출 조건에 대한 contour map



superimposing 하였을 때 중복되는 부분의 범위에서 최적 추출 조건 범위를 예측하였다.

Table 6:

종속변수	반응표면분석을 통하여 얻어진 이차 다항식 <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup>	유의성
Sonication	$Y_s = -20771 + 638.970917X_1 + 1344.781564X_2 + 188.568208X_3 - 0.770355X_1^2 - 55.610000X_1X_2 - 24.935521X_2^2 - 5.532000X_1X_3 + 13.390000X_2X_3 - 0.014681X_3^2$	0.5140	0.486
침출	$Y_c = -6469.876313 - 10.338182X_1 + 52.903014X_2 + 174.411212X_3 + 1.309470X_1^2 - 0.291124X_1X_2 + 0.555845X_2^2 - 1.179875X_1X_3 - 0.698873X_2X_3 - 0.656010X_3^2$	0.8785	0.1215
reflux	$Y_r = -1836.846961 + 129.509998X_1 + 336.320648X_2 + 46.540448X_3 - 15.234595X_1^2 - 17.477273X_1X_2 + 134.184611X_2^2 + 4.159992X_1X_3 - 7.60000X_2X_3 - 0.425534X_3^2$	0.8458	0.1542

<sup>1)</sup> Sonication/침출 : X<sub>1</sub>, 용매 온도 (°C); X<sub>2</sub>, 추출 시간(hr); X<sub>3</sub>, 용매 농도 (%)

<sup>2)</sup> reflux: X<sub>1</sub>, 차르기 시료(g); X<sub>2</sub>, 추출 시간(hr); X<sub>3</sub>, 용매 농도 (%)

반응표면분석을 통한 asarone의 최대 추출 조건에 관한 이차 다항식 반응표면분석을 통한 차르기의 최적 배합에 관한 반응표면모델식(response surface model equation)으로 표현했을 때의 R<sup>2</sup>는 sonication 0.5140, 침출 0.8785, reflux 0.8458로 Sonication을 제외하고는 반응모형이 적합한 것으로 나타났다.

⑤ 차즈기 Sonication 추출조건들의 배합 비율에 따른 수율에 관한 4차원 그래프

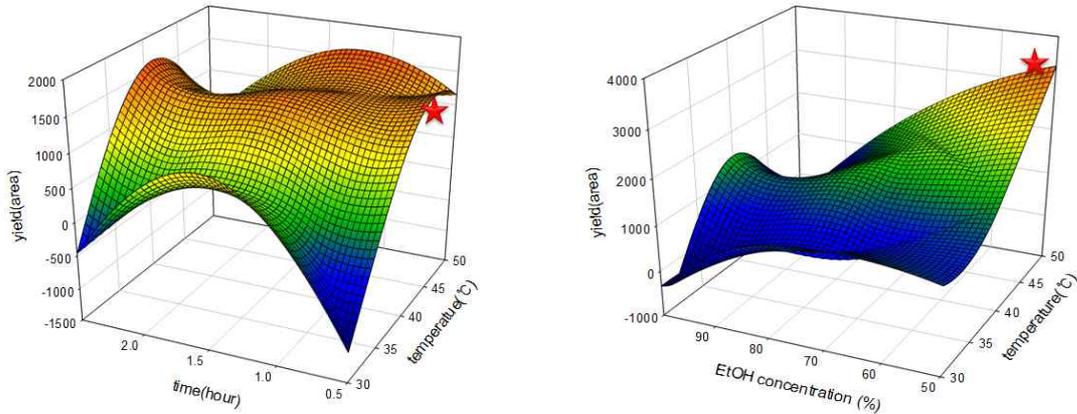


Fig. 33:

(좌): sonication 추출 조건의 온도, 시간, 수율 배합비율

차즈기 sonication 추출 조건에서 온도, 시간에 따른 수율을 보면 온도는 45°C, 시간은 1시간 30분에서 가장 높은 수율을 보인다.

(우): sonication 추출 조건의 온도, 용매, 수율 배합비율

차즈기 sonication 추출 조건에서 온도, 용매에 따른 수율을 보면 온도는 높을수록, 용매는 70%, 80% 주정에서 대체로 높은 수율을 보인다.

차즈기 Sonication 추출 조건에서 시간, 용매에 따른 수율을 보면 시간은 1시간 30분, 용매는 주정의 농도가 낮아질수록 대체로 높은 수율을 보인다.

⑥ 차즈기 침출 추출조건들의 배합 비율에 따른 수율에 관한 4차원 그래프

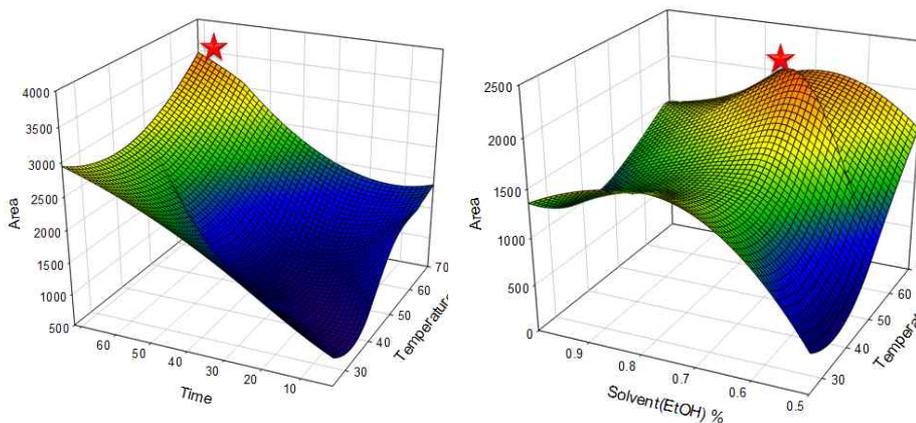


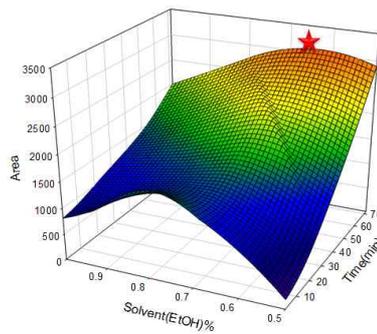
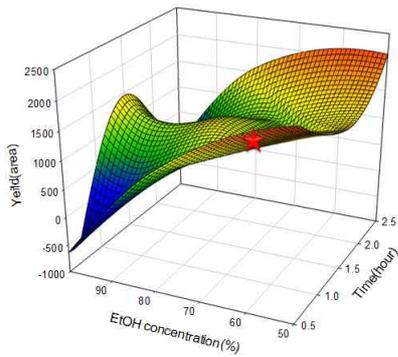
Fig. 34:

(좌): 침출 추출 조건의 시간, 온도, 수율 배합비율

차즈기 침출 추출 조건에서 시간, 용매에 따른 수율을 보면 시간은 길어질수록, 온도는 50°C에서 대체로 높은 수율을 보인다.

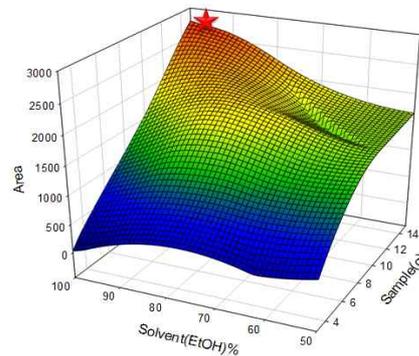
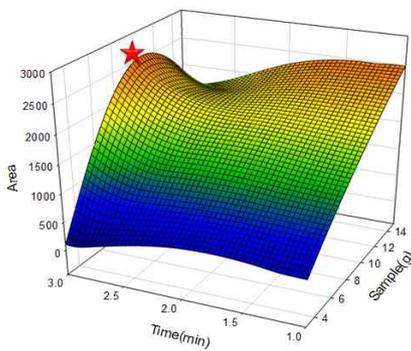
(우): 침출 추출 조건의 용매, 온도, 수율 배합비율

차즈기 침출 추출 조건에서 용매, 온도에 따른 수율을 보면 용매는 80% 주정에서, 온도는 50°C에서 대체로 높은 수율을 보인다.



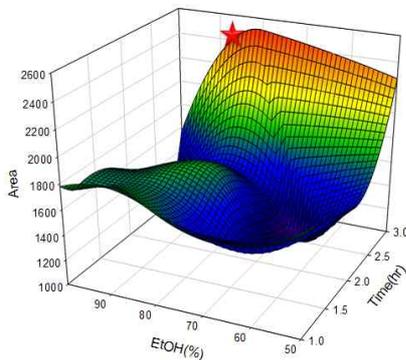
**Fig. 35:** 침출 추출 조건의 시간, 용매 수율 배합비율 차즈기 침출 추출 조건에서 시간, 용매에 따른 수율을 보면 시간은 길어질수록, 용매는 80% 주정에서 대체로 높은 수율을 보인다.

⑦ 차즈기 reflux 추출조건들의 배합 비율에 따른 수율에 관한 4차원 그래프



**Fig. 36: (좌): reflux 추출 조건의 시간, 시료, 수율 배합비율**  
차즈기 reflux 추출 조건에서 시간, 시료에 따른 수율을 보면 시간은 길어질수록, 시료는 많아질수록 대체로 높은 수율을 보인다.

**(우): reflux 추출 조건의 용매, 시료, 수율 배합비율**  
차즈기 reflux 추출 조건에서 용매, 시료에 따른 수율을 보면 용매는 90% 주정에서, 시료는 많을수록 대체로 높은 수율을 보인다.



**Fig. 37:** reflux 추출 조건의 시간, 용매, 수율 배합비율  
차즈기 reflux 추출 조건에서 시간, 용매에 따른 수율을 보면 시간은 길어질수록, 용매는 90% 주정에서 대체로 높은 수율을 보인다.

⑧ 차즈기 추출조건들의 배합조건 중 Asarone을 최대로 얻을 수 있는 예상수준과 이에

## 대한 최대 반응량

**Table 7:**

종속변수	X <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	X <sub>2</sub> <sup>1)</sup>	X <sub>3</sub> <sup>1)</sup>	최대값	형태
Sonication	47.345412	1.256981	59.161146	2701.248909	Saddle point
침출	53.060309	69.030516	68.397673	3221.203891	Saddle point
reflux	13.513108	1.452872	90.370196	2315.304730	Saddle point

<sup>1)</sup> Sonication/침출 : X<sub>1</sub>, 용매 온도 (°C); X<sub>2</sub>, 추출 시간(hr); X<sub>3</sub>, 용매 농도 (%)

<sup>2)</sup> reflux: X<sub>1</sub>, 차즈기 시료(g); X<sub>2</sub>, 추출 시간(hr); X<sub>3</sub>, 용매 농도 (%)

SAS 통계분석 프로그램을 이용한 결과 차즈기 추출조건에서 최대로 얻을 수 있는 예상수준은 sonication 추출 조건에서 용매 온도 47°C, 추출 시간 1시간 25분, 용매 농도 59.16% 주정에서 2701.25 area의 asarone을 얻을 수 있을 것이라 예상되었고, 침출 추출 조건에서 용매 온도 53°C, 추출 시간 69시간, 용매 농도 68.39% 주정에서 3221.2 area의 asarone을 얻을 수 있을 것이라 예상되었으며, reflux 추출 조건에서 차즈기 시료 13g, 추출 시간 1시간 45분, 용매 농도 90.37% 주정에서 2315.30 area의 asarone을 얻을 수 있을 것이라 예상되었다.

㉑ 차즈기 추출조건들의 배합조건 중 asarone을 최대로 얻을 수 있는 예상수준과 그에 대한 실제 수준

**Table 8:**

	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Asarone area	
	용매 온도(°C)	추출 시간(hr)	용매 농도(%)		
Sonication	47	1.25	59	예상치	2701
				실측치	2099
침출	53	69	68	예상치	3221
				실측치	1007.6
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Asarone area	
	차즈기 시료(g)	추출 시간(hr)	용매 농도(%)		
reflux	13	1.45	90	예상치	2315
				실측치	2751.7

Table 7의 결과를 바탕으로 asarone의 실측치를 확인하였다. sonication 추출 조건에서 2099 area의 asarone을 얻었고, 침출 추출 조건에서 1007.6 area의 Asarone을 얻었으며, reflux 추출 조건에서는 2751.7 area의 asarone을 얻었다.

(8)에서 (11)까지 요약설명한 기능성 원료의 표준화에 대하여 3차년도 동안 진행하였다.

## (8) 표준화와 지표성분

「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정(식약청고시 제2007-51호)」에 따르면 건강기능식품의 표준화를 위해서는 일반적으로 물리적(시간, 온도, 압력 등), 화학적(용매,

식품첨가물 등), 미생물학적(효소, 미생물, 대장균 등)등의 기본적인 관리요소 뿐만 아니라 “기능성”을 관리할 수 있는 지표를 설정하여 관리하여야 한다. 다시 말하면 건강기능식품에서의 표준화란 천연물질에 함유되어 있는 고유한 성분의 변동을 최소화하여, 생산되는 배치(batch)에 상관없이 일정한 품질을 유지하기 위해 원재료의 생산에서부터 제조과정 전반에 걸쳐 사용된 기술과 정보를 관리하는 것을 말한다. 이러한 “기능성”을 표준화되게 관리하기 위한 가장 일반적인 지표가 바로 기능성분(biologically active compound) 또는 지표성분(marker compound) 이다.

### (9) 지표성분 설정에 있어 고려하여야 할 사항

- (가) 특이성 : 원재료 또는 제조방법에 따라 특이적으로 존재하거나 차별적인 함량변이를 갖는 성분
- (나) 대표성 : 문헌조사 및 *in vivo*, *in vitro* 등의 실험을 통하여 추출물의 기능을 대표하는 성분 또는 추출물의 기능을 대표할 정도는 아니지만 추출물 중의 함량차이나 존재 유무 등에 따라 추출물의 기능에 관여하는 성분
- (다) 안정성 : 분리된 단일성분이 열, 빛, 습도 등의 일반적인 보관조건에서 안정성이 높은 성분
- (라) 용이성 : 분리된 단일성분이 HPLC, GC, UV 등과 같은 범용화된 분석기기를 이용하는 일반적인 방법, 상업적 표준물질의 사용가능 여부, 분석 비용 등을 고려

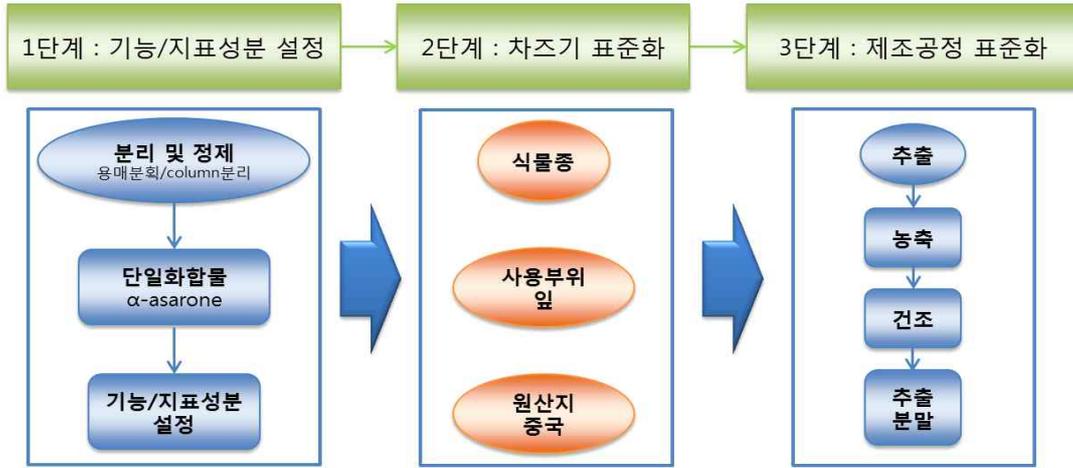
### (10) 천연물 원료의 개발 과정

- (가) 대상식물 선정 : 식용가능여부, 안정성, 지적재산권(특허, 논문), 경제성, 추출물 library 또는 공정서 등 검토
- (나) 후보소재의 활성물질 추적 : 조추출물 제조 (MeOH, EtOH, H<sub>2</sub>O 등), 용매분획, Column chromatography & Assay
- (다) 단일물질 분리 : 단일물질의 구조동정(NMR, HPLC, MS 등), 추출물과 단일물질의 활성 측정(*in vitro*, *in vivo*)
- (라) 지표(기능)성분 선정 : 효능시험 결과 분리된 단일물질이 표준추출물과 유사한 활성도를 나타내는 경우 분리된 단일물질을 기능성분으로 평가할 수 있다. 하지만 농도에 따른 효능의 증가가 뚜렷하지 않을 경우 기능성분으로 평가할 수 없고 지표성분으로 설정해야 한다.
- (마) 표준화 : 원료 표준화(원재료 유사종, 원재료의 부위, 원산지, 채취시기 고려해야한다.), 제조공정 표준화(추출용매, 추출온도, 용매비율, 추출시간, 추출 횟수, 건조방법 고려해야한다.)
- (바) 원료의 기준규격 설정 : 성상, 지표(기능)성분의 함량, 수분, 유해물질에 대한 표준화 과정의 결과를 토대로 설정

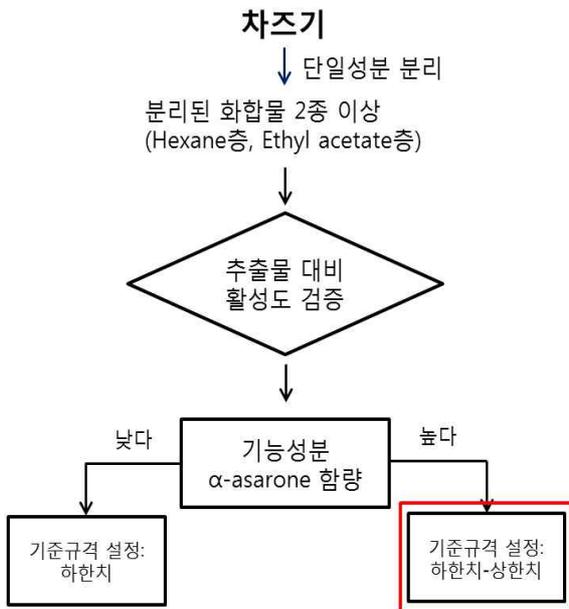
㉔ 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정 항목 : 특이성(Specificity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 정량한계(Quantitation Limit), 직선성(Linearity),

범위(Range)

(11) 기능성 원료 표준화 지침서에 따른 차즈기 기능성 원료 표준화 과정



(12) 차즈기 기능(지표)성분 기준규격 설정

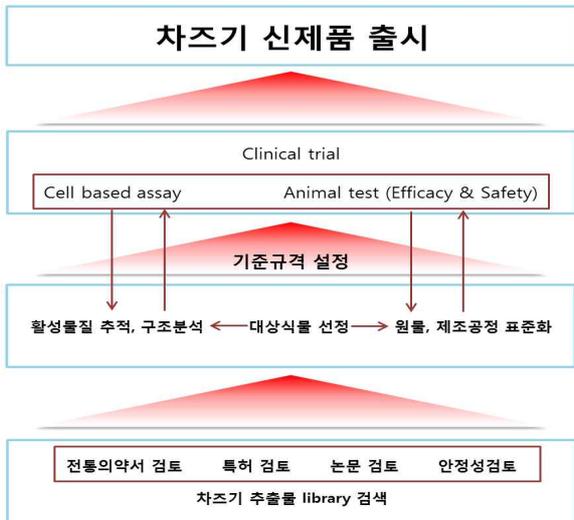


추출물로부터 분리된 화합물의 활성도를 검증한 결과 추출물 대비 50% 이상인 경우 기능성분으로 구분할 수 있다. 만약 추출물 대비 50% 이하인 경우 지표성분으로 구분할 수 있다. 기능(지표)성분의 함량이 95% 이상의 고순도일 경우에는 00% 이상으로 설정하는 것이 적절할 것이나 그렇지 않은 경우에는 앞에서 언급한 바와 같이 충분한 로트의 검사결과를 바탕으로 상한치와 하한치를 설정해야 한다. 추출물 중 기능(지표)성분의 함량변화가 추출물의 기능성에 미치는 영향이 큰 경우에는 기능(지표)성분의 범위를 추출물이 기능성에 큰 영향을 미치지 않는 상한치와 하한치의 함량범위로 설정한다. 추출물 중 기능(지표)성분의 함량변화가 추출물의 기능성에 미치는 영향이 적은

경우에는 기능(지표)성분을 하한치(00% 이상)로 설정하고, 이러한 경우 최소 2개 이상의 지표성분을 선정하는 것이 바람직하다.

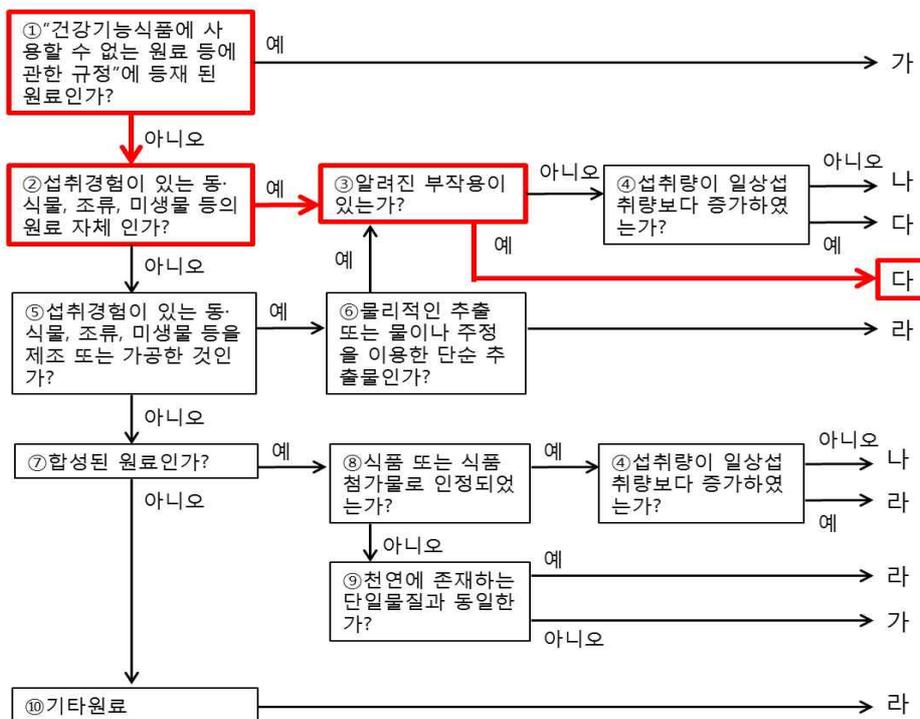
(13) 차즈기 건강기능식품개발 추진 체계도

첫 번째 단계를 통해 개발하고자 하는 대상 식물인 차즈기를 선정하였고, 두 번째 단계에서 선정된 차즈기를 이용하여 활성성분을 추적하고 원료 및 제조공정 표준화를 통해 기능성



원료의 기준규격을 설정하였다. 세 번째 단계에서는 표준화된 추출물을 이용하여 효능시험(*in vitro*, *in vivo*) 실험을 통해 기준규격을 설정하였다. 다음으로 표준화된 추출물을 이용하여 *in vitro*, *in vivo* 실험결과를 토대로 임상시험 설계를 통해 임상시험만 실시하게 된다면 최종 제품을 출시 할 수 있을 것으로 판단된다.

(14) 건강기능식품 기능성 원료의 안정성 평가를 위한 의사결정도



건강기능식품 기능성 원료의 안정성 평가를 위한 의사결정도를 차즈기에 적용시켰을 때 "다"로 나왔으며 「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정」에 따라 제출되어야 하는 안정성 자료의 범위는 아래와 같다.

제출되어야 하는 안정성 자료	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	√			
섭취 근거 자료 <sup>1)</sup>		√	√	√
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안정성 정보 자료 <sup>2)</sup>		√	√	√
섭취량평가자료 <sup>3)</sup>		√	√	√
영양평가자료, 생물학적유효성자료, 인체시험자료 <sup>4)</sup>			√	√
독성시험자료 <sup>5)</sup>				√

### (15) 건강기능식품 제품화 기술

(가) 마케팅 활용기술 : 마케팅을 활용하고자 할 때는 식약청장이 정한 건강기능식품 표시·광고심의기준, 방법 및 절차에 따라 심의를 받아야 하나 기준 규격으로 고시되었거나 인정된 기능성 내용만을 그대로 표시·광고하는 경우는 면제된다.

(나) 제품설계기술

(다) 제품가공 및 생산기술

(라) 제품포장기술

(마) 제품규격화기술

(바) GMP 확립기술 : "Good Manufacturing Practices"의 약자로 '품질이 보증된 제품을 제조하기 위해서 원료의 구입으로부터 완제품 제조 및 출하에 이르기까지 제조공정 전반에 걸쳐 제조설비와 그 운용에 관하여 지켜야 할 최소한의 요건을 규정한 것'으로 표준화된 작업관리와 위생관리로 항상 특정 기준의 제품 품질을 보장할 수 있는 생산체제를 확립할 수 있는 제도로 '우수건강기능식품제조기준'으로 나타낸다.

### (16) 제품의 대량생산공정에 맞는 시스템 구축 및 공정 개발

○ 재배지 조건에 따른 소재 표준화를 위해 재배지 별 소재를 수집하였다. 수집된 소재로 추출을 진행하였고 차이점을 확인하였다.

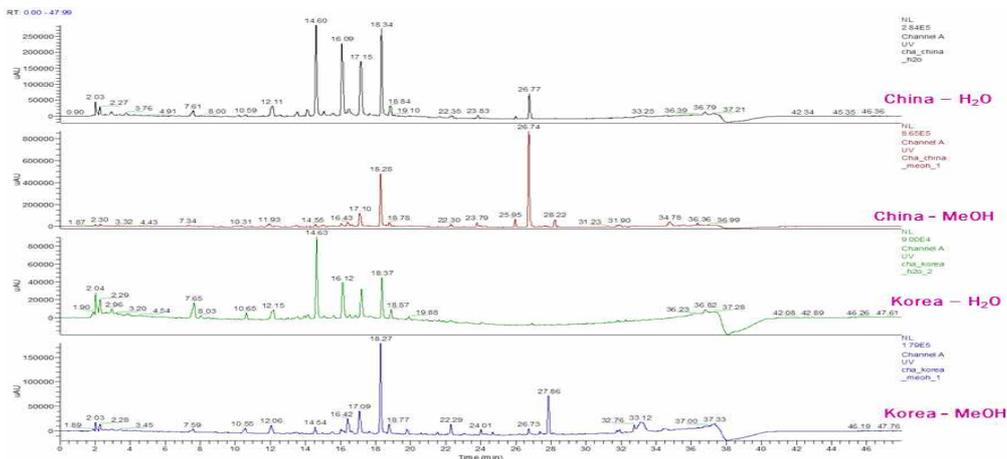


Fig. 38: 재배지 별 차르기 HPLC 차이점

국산과 중국산의 차이를 확인한 결과 국산의 효능보다 중국산의 효능이 더 좋았으며 중국산의  $\alpha$ -asarone 함량이 미량이었다. 또한 생산량이 한정되어있는 국산보다 생산량이 월등히 많은 중국산의 차즈기가 연구성과가 좋다고 판단하였다. 차즈기 가격 차이는 중국산 7,500원/kg, 국산 30,000원/kg으로 큰 차이를

차즈기 Ethanol 추출물의 활성을 나타내는  $\alpha$ -asarone을 지표성분 및 기능성분으로 설정하였으며, 제품표준화를 위한 validation을 하여 공정부분을 표준화하였다.

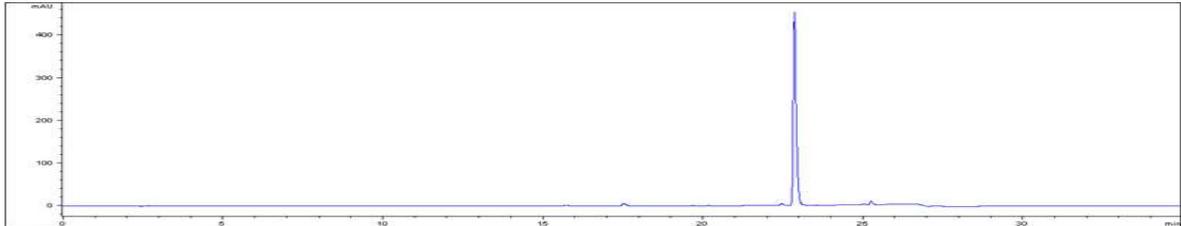


Fig. 39: HPLC of  $\alpha$ -asarone standards

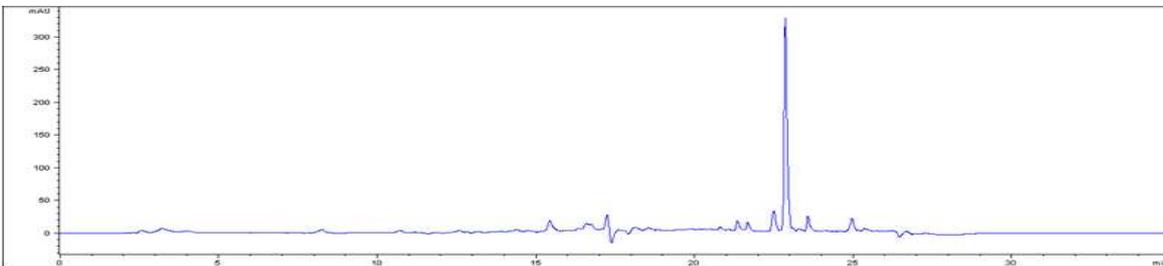


Fig. 40: HPLC of *Perilla frutescens*(차즈기) extraction with EtOH

본 연구에서  $\alpha$ -asarone에 대해 지표성분으로 시험법을 확립하고 검증(validation)한 후 함량을 평가하여 시험방법의 적합성과 타당성을 검증하였다. 분석용 시료의 제조는  $\alpha$ -asarone 표준품을 HPLC급 Methanol에 10mg/ml의 농도로 녹인 후, 0.45um 마이크로필터로 여과하였다. 제작된 표준액 4종을 Methanol로 희석하여 0.1, 0.05, 0.01mg/ml으로 총 3개의 농도의 표준액을 제작하여 검량선 제작에 사용하였다. 또한 차즈기 Ethanol 추출물은 HPLC급 Methanol에 녹여 1mg/ml 농도로 정확히 제조한 후, 0.45um 마이크로필터로 여과하여 HPLC 검액으로 사용하였다.

Table 9: Results of the linearity study for  $\alpha$ -asarone

Concentration( $\mu$ g/ml)	Area(AU) <sup>a</sup>	RSD(%)
100	5879.2 $\pm$ 122	2.94
50	2880.6 $\pm$ 44	2.16
10	482.9 $\pm$ 8.8	2.58
Slope		59959
Intercept		-116.94
Correlation coefficient(R <sup>2</sup> )		1

<sup>a</sup> Mean $\pm$ SD(n=3)

확립된 분석조건을 통하여 지표성분인  $\alpha$ -asarone의 검량선을 작성하였다. 최소 3개 이상의 농도를 선택하여 3회 측정하여 내부표준물질의 면적비를 이용하였으며, 상관계수( $R^2 = 1$ )를 통하여 높은 직선성을 나타내었다. 또한 각 지표성분들의 검출한계(LOD; 검체 중에 존재하는 분석대상물질의 검출 가능한 최소량), 정량한계(LOQ; 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 없는 검체 중 분석대상 물질의 최소량)를 구하였는데, 이 때 검출한계는  $S/N = 3$ , 정량한계는  $S/N=10$ 을 기준으로 정하였다.

**Table 10: Limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) for  $\alpha$ -asarone (n=2)**

Parameter	Concentration( $\mu\text{g/ml}$ )
LOD	0.1
LOQ	0.3

\* LOD:  $3.3 \times (\text{Standard deviation of the response/Slope of calibration curve})$

\* LOQ:  $10 \times (\text{Standard deviation of the response/Slope of calibration curve})$

HPLC법에 의한 정확도와 정밀도는 각 표준물질 당 200  $\mu\text{g/ml}$ , 100 $\mu\text{g/ml}$ , 50 $\mu\text{g/ml}$  3가지 농도로 하여 하루에 실험을 3번 시행하여 일 내(intra-day) 정밀성을 구하였으며, 3일간 반복 실험을 시행하여 일 간(inter-day) 정밀성과 정확성을 확인하였을 때 허용 기준을 만족하였다.

**Table 11: Accuracy and precision of the method for determination of  $\alpha$ -asarone**

A d d e d standard	Precision				Accuracy	
	Intra-day(n=3)		Inter-day(n=3)		(n=3)	
	Rt <sup>a</sup> (% RSD)	Area <sup>b</sup> (% RSD)	Rt <sup>a</sup> (% RSD)	Area <sup>b</sup> (% RSD)	Recovery (%) <sup>c</sup>	(% RSD) <sup>d</sup>
0.2 mg/ml	0.02	0.36	0.05	2.16	92.7	1.28
0.1 mg/ml	0.02	0.06	0.01	2.8	97.6	2.26
0.05 mg/ml	0.02	0.44	0.02	1.64	99.2	1.23
Repeatability injection(n=9)						

<sup>a</sup> Relative standard deviation of retention time.

<sup>b</sup> Relative standard deviation of peak area.

<sup>c</sup> Average percent recovery obtained from nine measurements.

<sup>d</sup> Relative standard deviation of recovery.

차즈기를 Ethanol에서 추출한 RSM을 진행하였는데, RSM 데이터를 위의 Validation을 통하여 추출물 파우더 g당  $\alpha$ -asarone의 양을 알아보았고 최대로 얻을 수 있는 조건을 결정하여  $\alpha$ -asarone 대량추출 조건을(차즈기 파우더:에탄올=1.3:10, 90% Ethanol, 70°C extraction, 2hour 30minute) 확립하였다.

Table 12:  $\alpha$ -Asarone content in *Perilla frutescens* samples

Runs	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	cold extraction(mg/g)	sonication extraction(mg/g)	Hot extraction(mg/g)
1	-1	-1	-1	16.69	6.71	20.02
2	-1	-1	1	16.90	6.08	15.27
3	-1	1	-1	31.72	14.70	16.50
4	-1	1	1	30.60	11.22	15.30
5	1	-1	-1	25.13	43.51	35.94
6	1	-1	1	27.16	10.95	46.30
7	1	1	-1	32.74	30.82	34.63
<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>28.39</b>	<b>17.26</b>	<b>64.06</b>
9	-2	0	0	30.15	22.98	9.94
10	2	0	0	34.67	38.62	46.85
11	0	-2	0	34.00	41.31	46.33
12	0	2	0	39.85	37.17	43.47
13	0	0	-2	13.74	38.12	49.09
14	0	0	2	20.50	27.55	30.61
15	0	0	0	19.50	33.18	50.37
16	0	0	0	22.08	30.94	41.46
17	0	0	0	18.86	33.06	43.67

(17) 제품의 대량생산공정에 맞는 시스템 구축 및 공정 개발 결과-제형 원료별 표준화 결과

(17-1) 열수추출의 제조공정 표준화

Table 13: 열수추출물의 제조공정별 수율 변화

제조공정	수율 (%)		
	Lot1	Lot2	Lot3
차즈기 열수추출물(200g X 4L) (온도 100℃, 추출시간 2시간)	10.13	11.51	10.91

(17-2) 파우치 음료의 제조공정 표준화

Table 14: 파우치 제조공정별 지표성분 TPC 함량 변화

제조공정	Total phenol 함량		
	Lot1	Lot2	Lot3
원물 (mg/g dry weight)	131.26(mg/g)		
차즈기 파우치 추출액 (5brix)	63.63	67.66	66.03

(200g X 4L) (온도 100℃, 추출시간 2시간 열수추출) (mg/ml)			
---	--	--	--

(17-3) 티백 제품의 제조공정 표준화

Table 15: 티백 제조공정별 지표성분 TPC 함량 변화

제조공정	Total phenol 함량		
	Lot1	Lot2	Lot3
원물 (mg/g dry weight)	131.26(mg/g)		
차즈기 제품화 티백 (1.5g) (100ml, 열수추출) (온도 100℃, 추출시간 3분) (mg/ml)	193.89	196.24	190.27

차즈기 열수추출물의 Total phenol 및 항산화 물질이 풍부하여 차즈기 차를 제품화하는 데에 문제가 없을 것으로 판단된다.

(17-4) Capsule 제형 표준화를 위한 추출물 제조공정 표준화

$\alpha$ -asarone 최대 함량 추출조건 RSM에서 잡힌 최적조건에 따라 차즈기 1kg을 90% Ethanol 7.7L, 70℃에서 2시간 30분 동안 추출을 진행하였다.

Table. 16: Capsule 제조공정별 지표성분  $\alpha$ -asarone 함량 변화

제조공정	$\alpha$ -asarone 함량		
	Lot1	Lot2	Lot3
원물 (mg/g dry weight)	8.03		
추출물 (mg/ml)	19.47	19.74	20.20
농축물 (60brix) (mg/ml)	97.40	95.55	94.64
동결건조물 (mg/g extract)	47.84	44.70	46.24

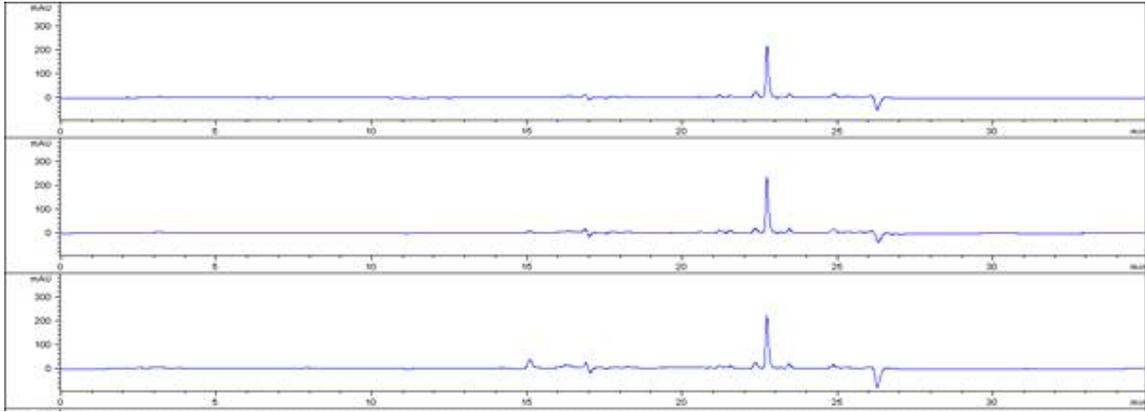


Fig. 41: 차즈기 Capsule 제조공정에서 원물의 Lot 1,2,3 HPLC

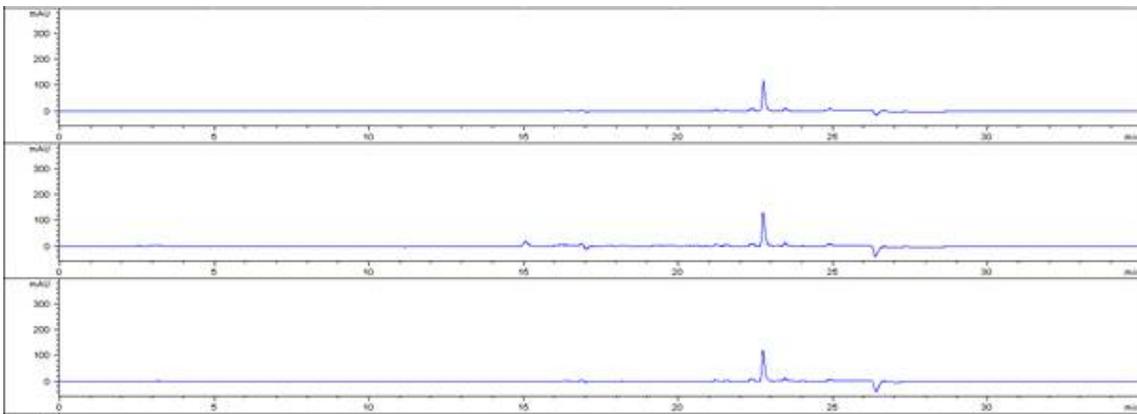


Fig. 42: 차즈기 Capsule 제조공정에서 추출물의 Lot 1,2,3 HPLC

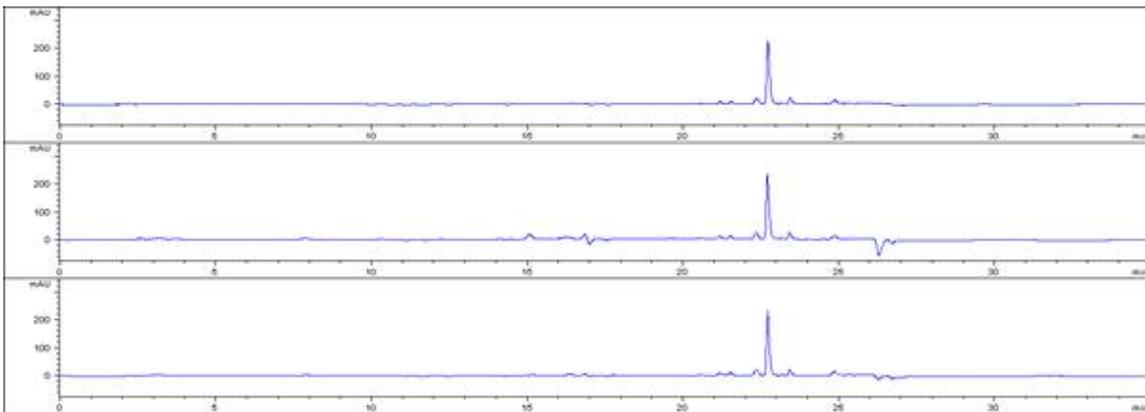


Fig. 43: 차즈기 Capsule 제조공정에서 동결건조물의 Lot 1, 2, 3 HPLC

차즈기 Ethanol 추출물에서 활성을 나타내는  $\alpha$ -asarone을 지표성분 및 기능성분으로 설정하였으며, 제품표준화를 위한 validation을 티백, 파우치, Capsule 총 3가지 조건으로 하여 공정부분을 표준화하였다.

$\alpha$ -asarone을 대상으로 validation을 진행하였고 3 Lot로 기준규격을 설정하여 그 규격에 함량으로 생산을 할 계획에 있다.

차즈기 추출물 파우더 g당  $\alpha$ -asarone의 양을 알아보았고 최대로 얻을 수 있는 조건을 결정하여  $\alpha$ -asarone 대량추출 조건을 확립하여 목표 대비 달성하였다.

제 2 세부에서 차즈기 추출물 20mg/kg/day부터 100mg/kg/day까지 간,신장 독성에 대한 영향 및 혈액 내 콜레스테롤 및 TG농도에 대한 영향, 콜레스테롤 대사 효소활성 측정에서 효능을 보였다. 쥐 섭취함량의 1/5로 사람이 섭취한다 하였을 시 20mg/kg/day를 섭취한다 해도 차즈기 통상 1일 섭취허용량 1.2g/60kg을 수율 10.85%에 비교를 하였을 때 130.2mg/60kg(2.17mg/kg)으로 현저히 미치지 않는 것을 보았을 때 독성평가가 불필요할 것으로 사료된다.

(18) 제품의 다양한 활성 및 기술 확대를 위한 개발 내용

(18-1) 차즈기 추출물의 항산화성분인 TPC(total polyphenol contents)함량, DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 최적 활성 및 최대 추출 조건 확립 (RSM)

Table 17: Range of coded and actual values for central composite design

Independent variable	Symbol	Coded level				
		-2	-1	0	1	2
Temperature(°C)	X1	50	60	70	80	90
Liquid to raw material ratio(mg:g)	X2	33:1	43:1	53:1	63:1	73:1
Ethanol concentration(%)	X3	0	10	20	30	40

차즈기 추출물을 이용하여 항산화와 관련있는 TPC와 DPPH를 확인하였고, 최적 활성 추출 조건을 확립하기 위하여 조건을 확립하여 RSM을 진행하였다.

Table 18: Central composite design with the observed responses for *Perilla frutescens*

No.	X1	X2	X3	Total extraction Yield(%)	TPC (mg/g)	DPPH (억제율, %)
1	60(-1)	43:1(-1)	10(-1)	19.50	86.56	31.38
2	60(-1)	43:1(-1)	30(+1)	16.76	93.30	27.11
3	60(-1)	63:1(+1)	10(-1)	19.51	82.99	21.99
4	60(-1)	63:1(+1)	30(+1)	18.34	94.08	33.00
5	80(+1)	43:1(-1)	10(-1)	21.46	94.76	39.83
6	80(+1)	43:1(-1)	30(+1)	20.88	99.86	36.89
7	80(+1)	63:1(+1)	10(-1)	22.09	93.93	38.50
8	80(+1)	63:1(+1)	30(+1)	23.26	94.68	31.19
9	50(-2)	53:1(0)	20(0)	17.41	87.35	39.73
10	90(+2)	53:1(0)	20(0)	22.85	92.54	33.47
11	70(0)	33:1(-2)	20(0)	20.30	94.76	35.65
12	70(0)	73:1(+2)	20(0)	21.02	88.55	40.87
13	70(0)	53:1(0)	0(-2)	22.25	80.49	28.06
14	70(0)	53:1(0)	40(+2)	14.86	99.58	21.99
15	70(0)	53:1(0)	20(0)	17.46	98.96	49.32
16	70(0)	53:1(0)	20(0)	17.88	98.52	58.24
17	70(0)	53:1(0)	20(0)	17.55	106.60	66.12

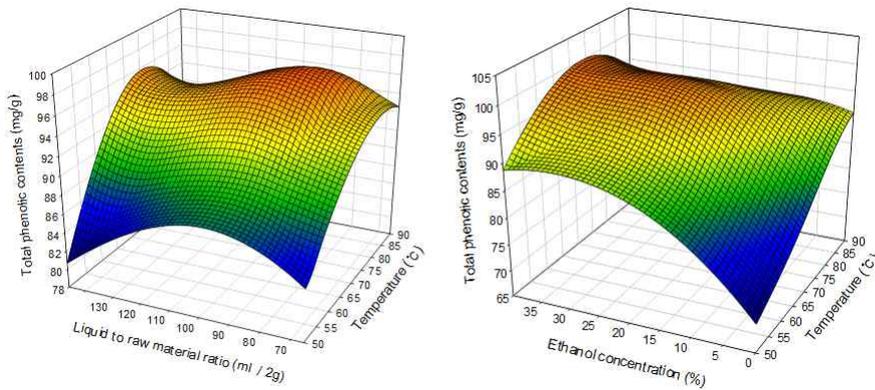


Fig. 36: Sigma plot showing the effects of different extraction parameters in *Perilla frutescens*.

Table 19: SAS 프로그램을 이용한 최적조건 확립

	R-Square	Stationary point	Maximum Response		
			X1 (Temperature, °C)	X2 (sample-solvent ratio, mg/g)	X3 (Ethanol concentration, %)
수율	0.8911	saddle point	87.06	31.68	21.34
DPPH 억제율	0.7684	saddle point	84.73	41.47	12.92
TPC (mg/g)	0.8013	maximum	78.77	19.80	31.99

SAS 프로그램을 이용하여 R-Square 및 Stationary point, Maximum response를 확인한 결과 R-Square 값은 모두 0.7 이상으로 유의적인 결과를 보여주었고, Stationary point는 수율 및 DPPH 억제율에서 saddle point (안장점)을 보였다. 수율, DPPH 억제율, TPC에서 각각의 Maximum Response를 나타내고 있다.

Table 20: SAS 프로그램을 이용한 최적조건의 예상치 및 실측치 확인

	Predict value	Experimental value
수율(%)	24.969	22.686
DPPH 억제율(%)	38.13	78.11
TPC(mg/g)	99.21	131.26

SAS 프로그램을 이용하여 최적조건을 확립하였으며, 최적조건 예상수치에 따른 실측수치를 확인한 결과 수율 및 TPC의 예상수치와 실제수치가 비슷함을 확인할 수 있었다.

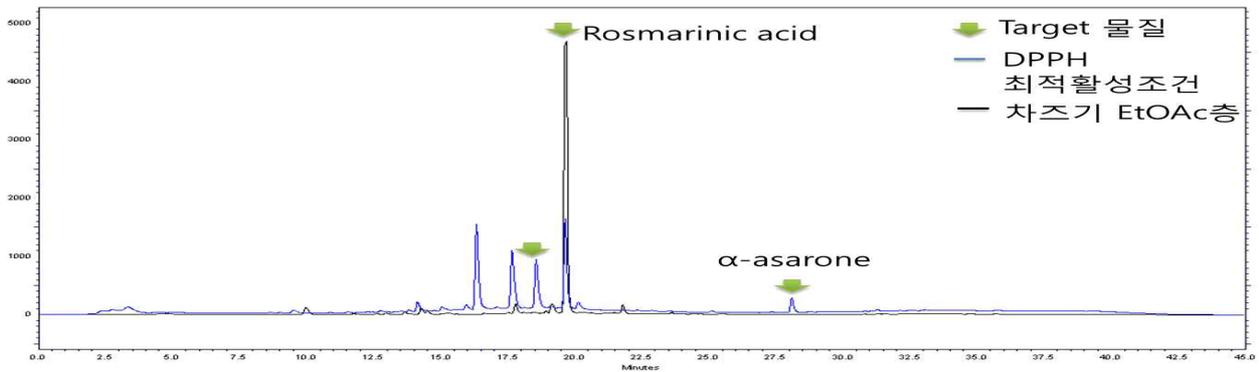


Fig. 37: DPPH HPLC Off-line coupling을 이용한 활성 성분 확인

DPPH 최적활성조건 추출물을 이용하여 HPLC off-line coupling을 진행하여 활성성분에 대하여 확인하였는데 대표적인 물질인 Rosmarinic acid의 peak가 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

#### (8-2) 차즈기 콜레스테롤 관련 다른 기전인 Xanthine Oxidase 억제 물질 확인 및 확보를 위한 분리 연구

Xanthine oxidase는 생체 내 퓨린 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 요산을 생성하며, 이 과정에서 활성산소종을 생성한다. 요산이 과도하게 생산되어 혈장 내에서 증가되면 관절이나 주위 조직 및 신장 등에 침착되어 염증을 일으키고, 이로 인하여 통증 및 신장질환을 일으킨다고 알려져 있다. 따라서 통풍 개선제는 xanthine oxidase의 저해능을 측정하여 탐색한다.

고지혈증은 oxidative stress 증가와 lipid peroxidation을 일으킨다. Xanthine oxidase를 억제하면 Superoxide 생성을 억제하는 것과 같은 기작이기 때문에 고지혈증을 치료하는데에 이용할 수 있다. 차즈기를 이용하여 Xanthine oxidase 저해능을 측정해보고 억제물질을 확인해보았다.

Table 21: 차즈기 Fraction별 Xanthine oxidase 억제율 확인

Fraction	Concentration(mgmL <sup>-1</sup> )	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (mgmL <sup>-1</sup> )
Total	0.2	42.79	-
	0.05	11.86	
	0.01	0.00	
Hex.	0.2	24.31	-
	0.05	10.01	
	0.01	0.00	
MC.	0.2	18.23	-
	0.05	3.96	
	0.01	0.00	
EtOAc	0.2	100.58	0.04
	0.05	45.07	
	0.01	8.78	
BuOH	0.2	41.13	-
	0.05	17.78	
	0.01	2.15	
Water	0.2	2.20	-
	0.05	0.00	
	0.01	0.72	
Allopurinol	0.05	76.42	0.004 (Reference)
	0.01	57.46	

차즈기 Fraction별 Xanthine oxidase 억제 율을 확인하였을 때 Ethyl acetate층에서 좋은 활성을 보여 Ultra-filtration을 통하여 억제에 관여하는 화합물을 확인하였다.

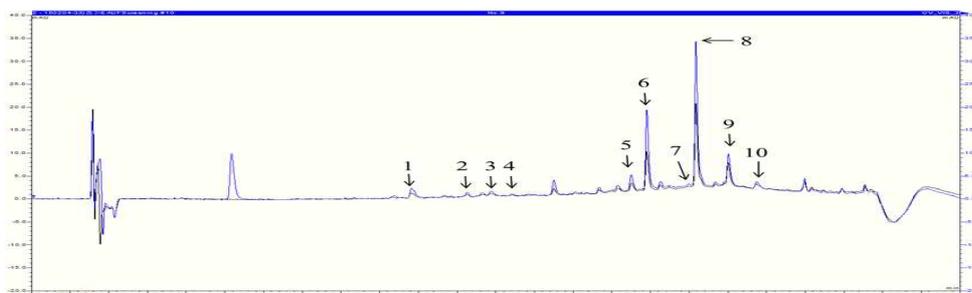


Fig. 38: HPLC chromatograms of the chemical constituents of *Perilla frutescens*

기존에 알려진 Rosmarinic acid의 xanthine oxidase 억제성분 외에 본 연구에서 새로운 물질을 확인하였다.

차즈기 EtOAc층에서 Xanthine oxidase 억제 활성이 가장 좋았기 때문에 EtOAc층을 이용하여 Sephadex LH-20을 차즈기 EtOAc층 6g을 로딩 하여 Methanol 40% 전개용매로 흘려주어 진행하였다.

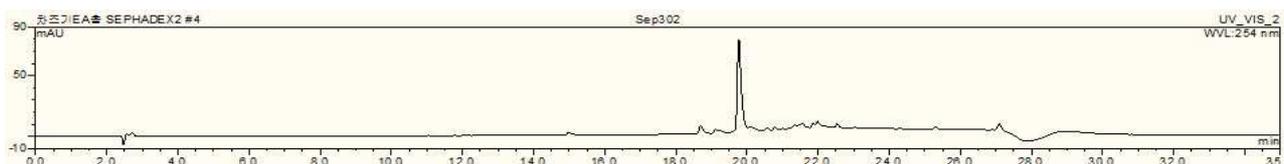
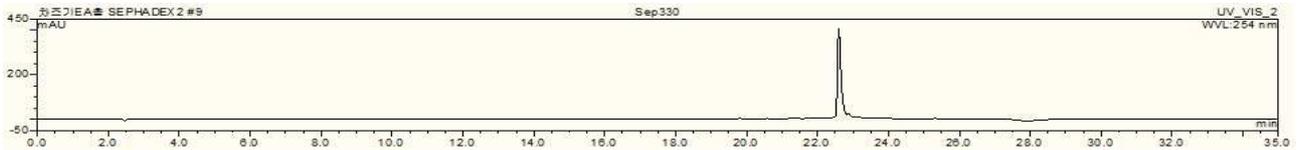


Fig. 39: EtOAc층의 Xanthine oxidase 억제 성분 중 Compound 5, 9번



Unknown compound를 분리하여 NMR 및 EI-Mass를 이용하여 구조동정을 하였다.

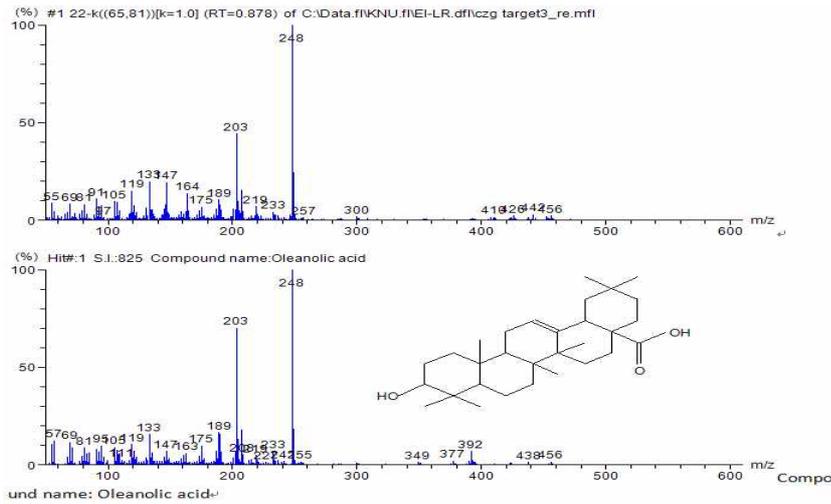


Fig. 40: Compound 5번의 EI-MS library search 결과

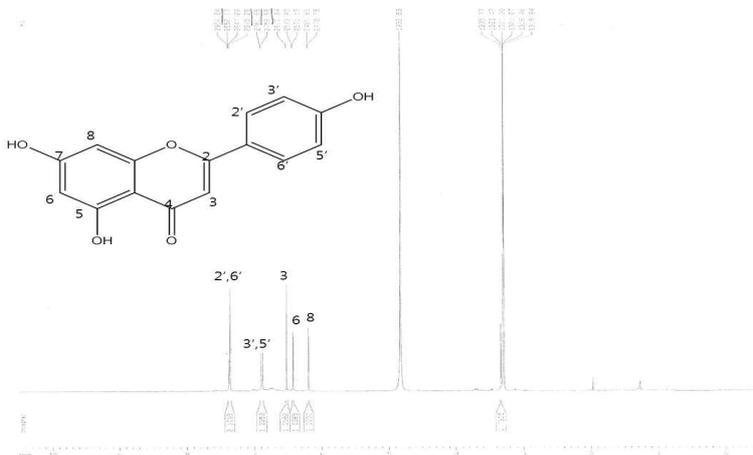


Fig. 41: Compound 9번의 <sup>1</sup>H NMR 결과

○ <sup>1</sup>H NMR 및 EI-MS library search를 이용한 결과 Compound는 apigenin 및 Oleanolic acid로 확인되었다.

**Table 22: Activities of the related compounds to inhibit xanthine oxidase**

No.	Compounds	Inhibitory rate (%) <sup>a)</sup>	IC50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <sup>b)</sup>
1	Protocatechuic acid	22.58	WI
2	Chlorogenic acid	21.32	WI
3	Caffeic acid	26.07	WI
4	4-Methoxycinnamic acid	22.02	WI
5	Oleanolic acid	29.68	WI
6	Rosmarinic acid	28.79	WI
7	Luteolin	64.51	3.06
8	Methyl-rosmarinic acid	26.51	WI
9	Apigenin	58.37	10.26
10	5',7,4-trimethoxyflavone	36.85	WI
-	Kaempferol-3-O-rutinoside	25.09	WI
-	$\beta$ -sitosterol	17.46	WI
	Allopurinol	46.02	17.64

a) All of the concentrations were 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , when the inhibitory rate was determined.

b) WI, weak inhibition, inhibitory effect < 50% at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$

분리된 13가지 화합물 중에서 억제율이 제일 높은 화합물을 확인한 결과 7번 Luteolin과 9번 Apigenin이 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 50% 이상의 억제율을 보이며 높은 활성을 나타내었다.

**(8-3) 차즈기 80% Methanol 추출물 및  $\alpha$ -asarone의 determination of reducing power 확인**

**Table 23: 차즈기 80% Methanol 추출물 및  $\alpha$ -asarone의  $\text{Fe}^{3+}$  환원력 확인**

농도(mg/ml)	Final concentration (ug/ml)	quercetin	750nm 차즈기 80% Methanol	$\alpha$ -asarone
10	1176.471		2.257	2.164
5	588.2353	2.446	2.225	2.009
1	117.6471	2.314	0.74	1.073
0.5	58.8235	2.009	0.493	0.649
0.1	11.7647	0.522	0.151	0.121
0.05	5.8823	0.375	0.1	0.071
0.01	1.1764	0.109	0.046	0.044

차즈기 80% Methanol 추출물 및  $\alpha$ -asarone의  $\text{Fe}^{3+}$  산화환원을 이용한 항산화능력(FRAP)을 확인하였을 때 차즈기의 높은 항산화력을 확인할 수 있었다.

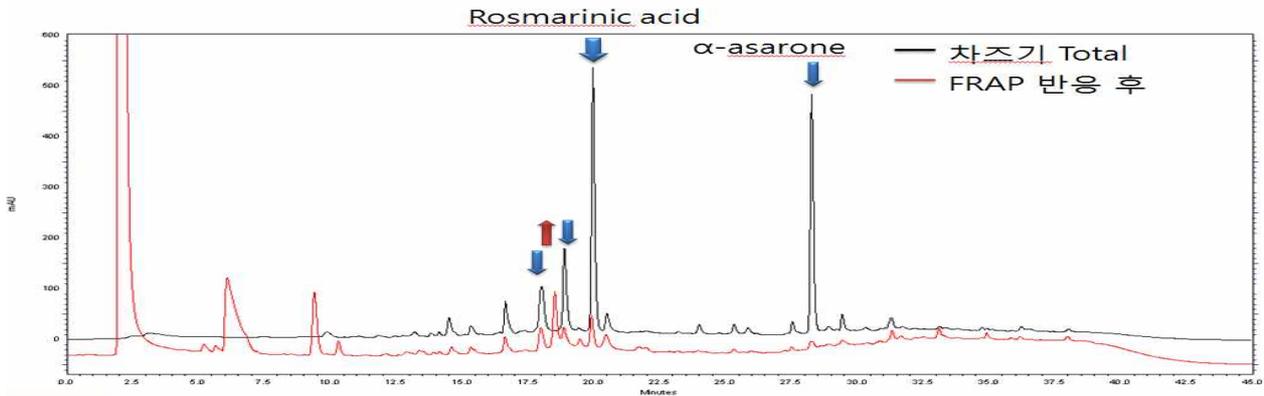


Fig. 42: HPLC off-line coupling을 이용한 FRAP 확인

Ferric Reducing Antioxidant Power를 이용하여 HPLC off-line coupling을 하였을 때, α-asarone과 Rosmarinic acid에서 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

(8-4) 차즈기 분획물 별 지질산화(Thiobarbituric acid reactive substance) 억제 효능 측정

차즈기 80% Methanol 추출물을 극성 별로 분획한 분획물의 TBARS를 측정하였다. 지질과산화(lipid peroxidation)는 지질 성분인 불포화지방산에 산소가 첨가되어 과산화된 지질이다. 이것은 유리기(free radical)로부터 세포나 조직막이 손상된 것을 의미한다. 생체 내에서의 과산화현상은 세포막의 주요구성성분인 인지질을 구성하는 불포화지방산이 산소유리기와 결합하여 생기게 된다. 과산화지질은 세포막의 다중불포화지방산과 지단백질에서 유리기와 연쇄반응하여 부산물로 MDA(malondialdehyde)를 생산하며, MDA는 지질과산화의 지표로 사용된다.

Table 24: 차즈기 분획물 별 TBARS (malonaldehyde 생성량) 확인

	control	positive control (BHT 1mM)	HEX층 (10mg/ml)	MC층 (10mg/ml)	EA층 (10mg/ml)	BuOH층 (10mg/ml)	Water층 (10mg/ml)
0day	4.64	6.88	7.22	6.24	5.71	7.85	4.09
1day	4.79	2.47	3.48	8.64	7.03	9.34	7.02
3day	7.22	6.56	6.32	8.54	7.17	9.46	6.01
5day	7.41	6.87	6.63	8.83	8.44	9.62	7.12
7day	7.41	6.87	7.24	8.83	8.44	9.62	7.12
14day	7.77	3.25	8.58	8.67	8.31	9.64	4.39

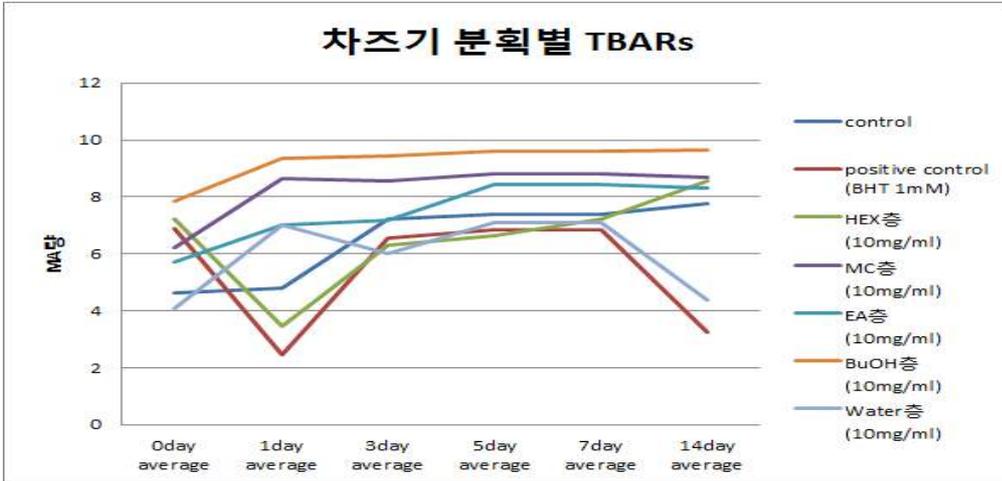


Fig. 43: 차즈기 분획별 MDA량 측정

차즈기 분획별 TBARS에서 차즈기의 물층에서 positive control인 BHT와 비슷한 패턴으로 2주차에 감소함을 나타내고 있었으며 차즈기 물층이 MDA 생성을 억제해주는 것을 확인할 수 있었다.

(8-5) 차즈기 MC분획물 ER stress 억제물질 구조규명

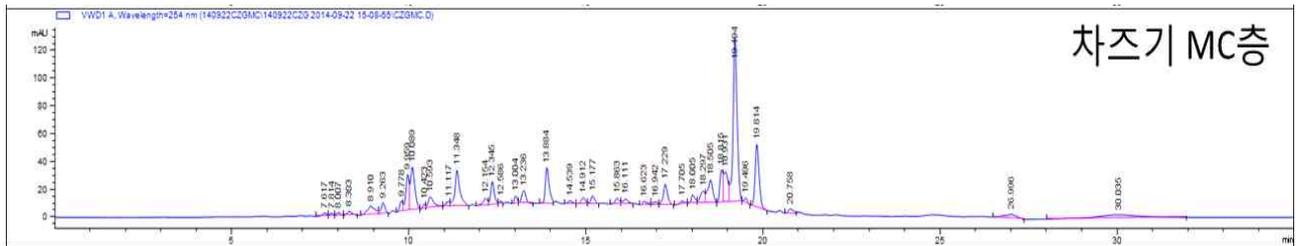


Fig. 44: ER-stress 억제에 효능이 있는 차즈기 MC층 HPLC pattern

ER-stress 억제효능이 있는 차즈기 MC층을 Silica gel을 이용하여 open column을 진행하였다. 시료는 MC층 3g을 이용하였으며, 전개용매는 Hex:EtOAc 2:1, 1:1, EA단독으로 흘려주었고 총 20개의 fraction을 나누었다.

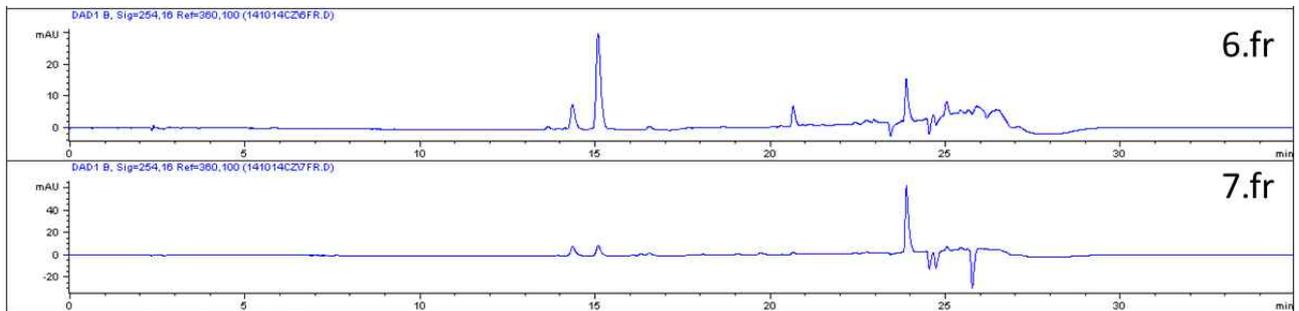


Fig. 45: 차즈기 MC층 Silica gel 분리 후 ER-stress 억제 활성 peak 확인

Silica gel을 이용하여 20개의 fraction으로 나눈 차즈기 MC층에서 ER-stress 억제 활성이 좋은 6, 7번 fraction을 확인하였다. 이 후 Sephadex LH-20으로 재 분리 하였으며 활성 물질을 구조동정 중에 있다.

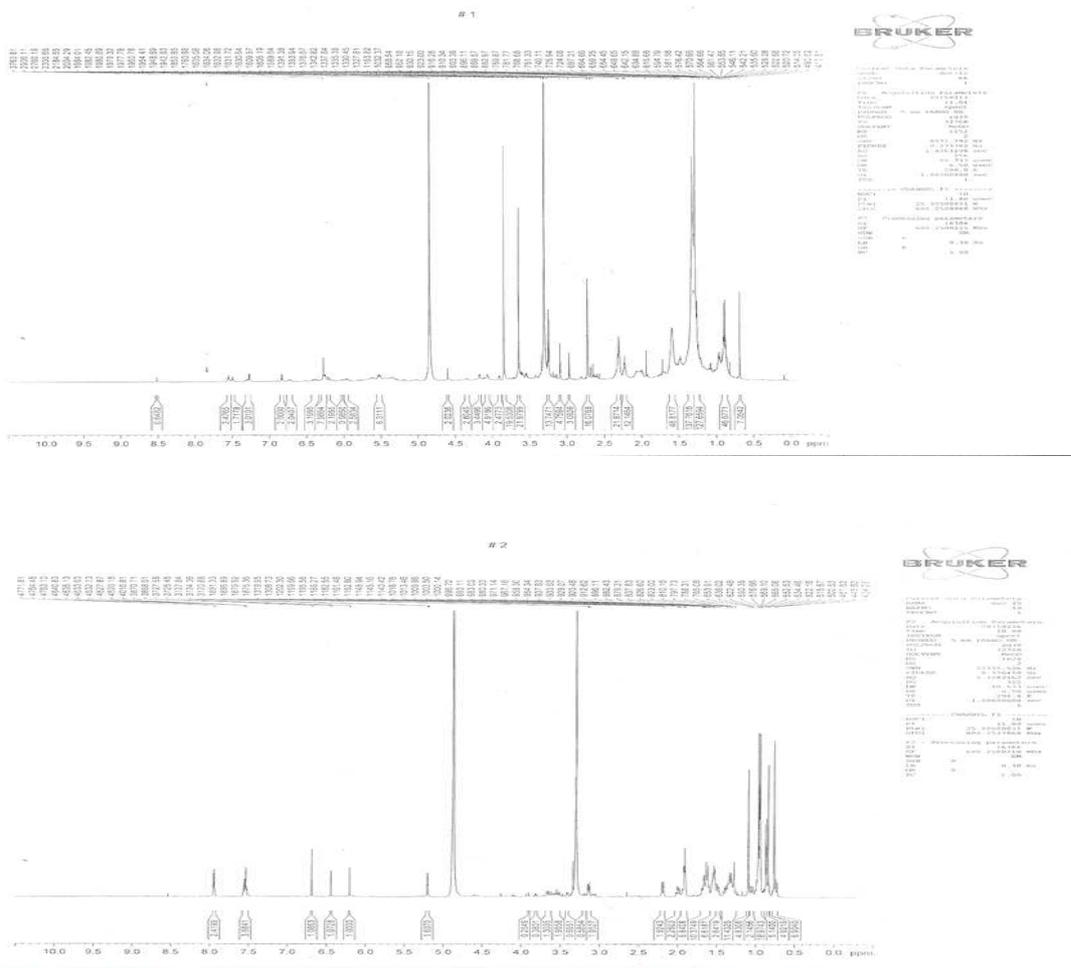


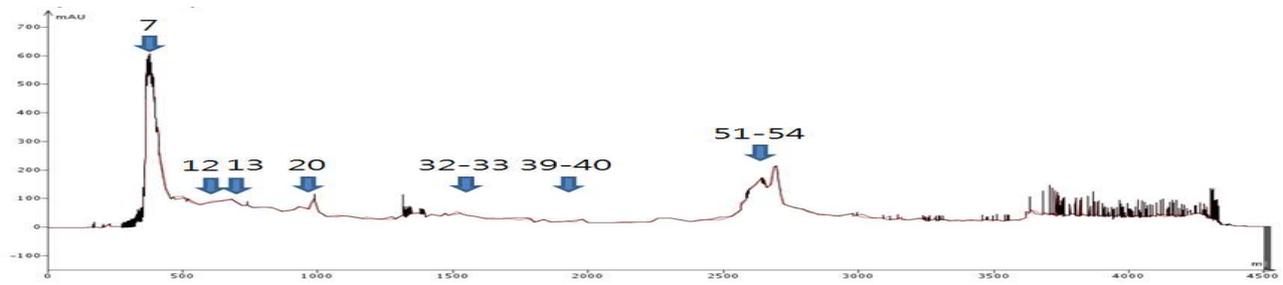
Fig. 46: 차즈기 MC층 구조동정 중인  $^1\text{H}$  NMR data

### (8-6) 차즈기 MC분획물 ER stress 억제물질 구조규명을 위한 추가 성분분리

고정상과 이동상을 모두 액체로 이용하는 액체-액체 분배 크로마토그래피 (High-Speed counter-current chromatography, HSCCC)를 이용하여 차즈기 MC 분획물의 성분을 분리하였다.

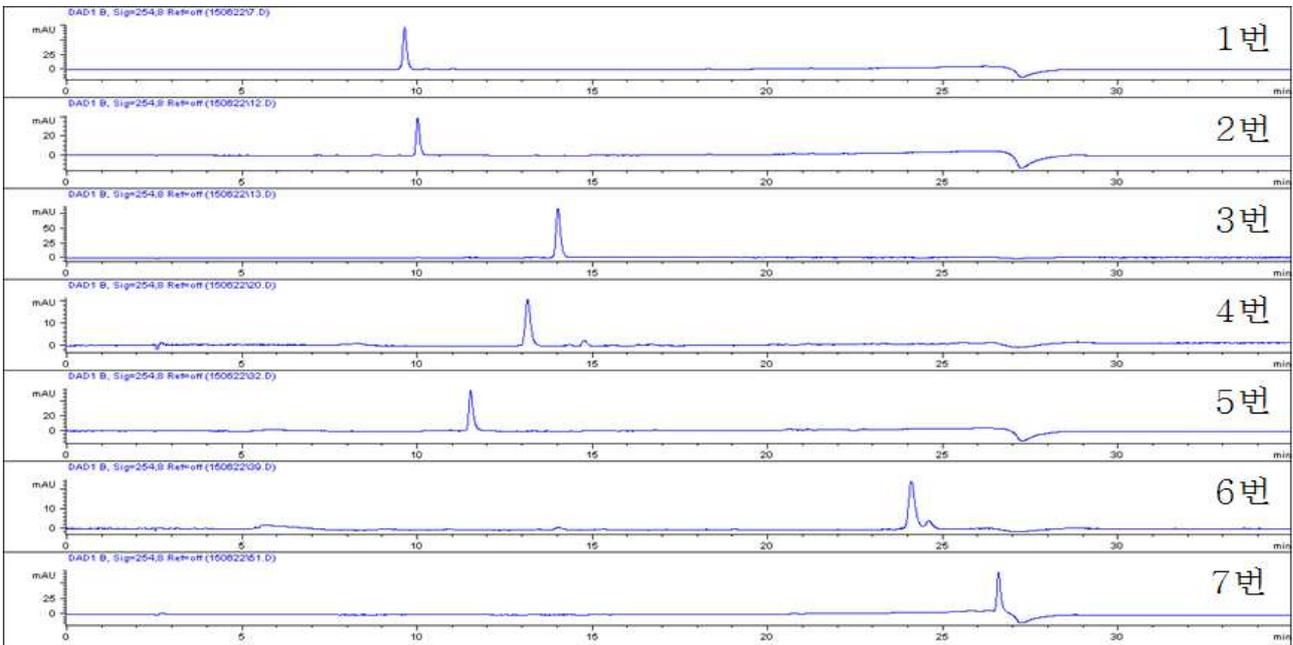
Hexane:EtOAc:Methanol:Water=1:1:0.1:1 비율의 조건으로 시작을 하였으며 위의 용매 비율로 혼합하였을 시에 두 층으로 나뉘게 되는데, 보통 상층에는 비극성 용매인 Hexane:EtOAc가 있게 되고 하층엔 극성용매인 Methanol:Water로 이루어지게 된다. 제조한 비율에 따른 용매의 상층과 하층을 각각 20ml씩 옮겨담은 후 Sample 2g에 상층과 하층을 섞은 총 40ml의 용매에 Sample 2g을 녹인 후 HSCCC에 주입시켰다.

Flow rate는 5ml/min으로 10분에 1개의 test tube를 받아 1개의 test tube당 50ml씩 받았으며, 용매 비율을 Methanol을 x로 두었을 때, 0.1부터 3까지 올려주었다. HSCCC RPM은 400이었으며 Head to tail 방식을 이용하였다.



**Fig. 47: 차즈기 MC분획물 HSCCC graph (254nm)**

표시된 화살표의 숫자가 분리된 화합물의 Test tube 순번이며 총 7개의 단일물질이 분리되었다.

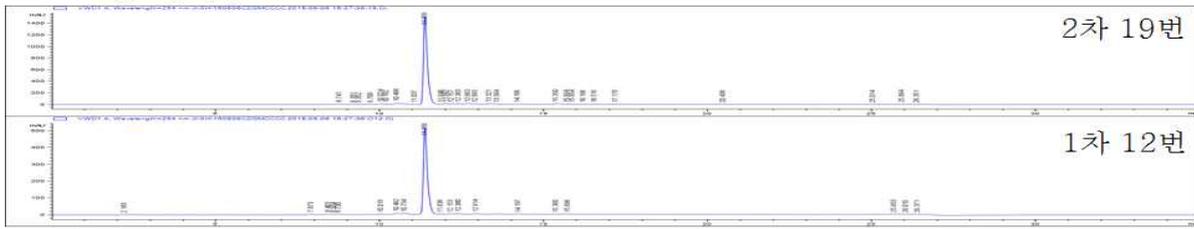


**Fig. 48: 차즈기 MC분획물에서 분리된 7가지 단일화합물 peak (254nm)**

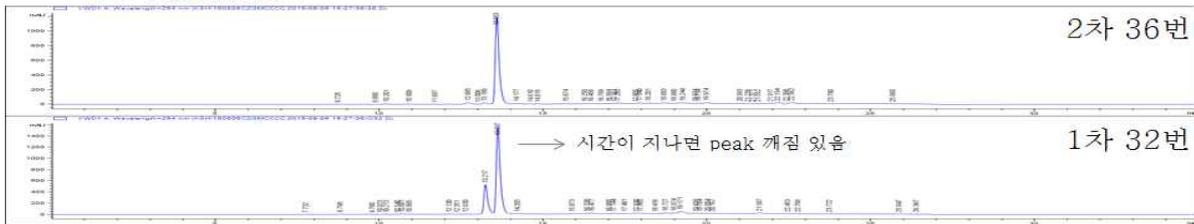
Agilent technology 1100 HPLC를 물질 분석에 사용하였고, 조건으로는 column: Eclipse Plus C<sub>18</sub>(150× 4.6 mm, 5 μm, Agilent); column temperature, 30°C; mobile phase, 0.1% TFA (solvent A) and MeOH (solvent B); HPLC analysis, 0 - 5 min, linear gradient from 5-35%, 5 - 23 min, linear gradient from 35-100%, 23 - 35 min, linear gradient from 100-5% B. Flow rate, 0.7 mL/min; detection, 254nm; injection volume, 10 μl 실시하였다.

단일화합물의 양 확보를 위해 2차로 같은 방식의 HSCCC를 진행하였으며 2, 4, 5, 7번의 단일화합물을 추가로 얻었다.

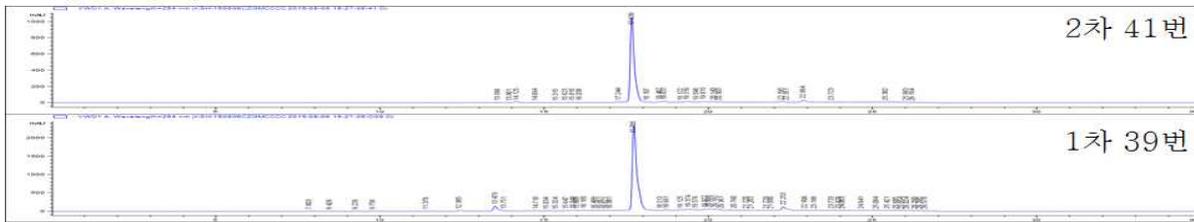
• 2번 Compound



• 4번 Compound



• 5번 Compound



• 7번 Compound



Fig. 49: 차즈기 MC분획물에서 추가로 분리된 4가지 단일화합물 peak (254nm)

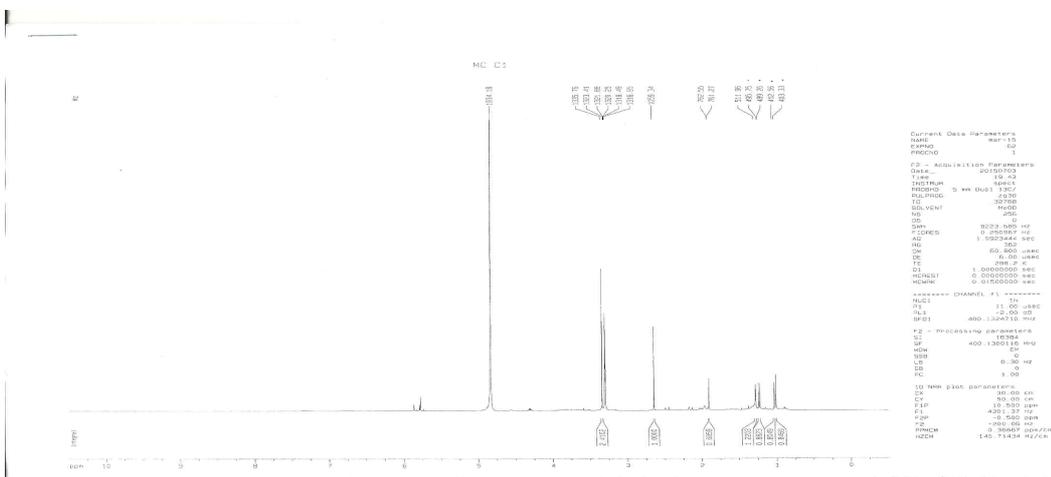






Fig. 50: 차즈기 MC분획물에서 분리된 7가지 단일화합물  $^1\text{H-NMR}$  data

7개의 단일화합물의 구조동정을 위해  $^1\text{H-NMR}$  및 EI-MS를 이용하여 데이터를 확인하였다.  $^1\text{H-NMR}$ 을 통하여 기본적인 화합물의 골격을 확인하였으며 화합물 1, 2, 3번은 amine계열의 화합물인 것으로 확인하였다. 화합물 4번은 propenoic acid 계열, 화합물 5번은 지방산과 flavonoid가 붙어있는 구조, 6, 7번은 oleanolic acid(triterpene 계열)로 추정하고 있다.

### (9) 제품의 안정성 평가-가속시험

제품의 안정성 평가를 위해 가속시험에 대한 이전 연구 자료들을 검색하여 조건을 습도 60%, 온도 50°C, 1주별 성분 check로 설정하였으며 시료는 차즈기차, 파우치, 파우더(capsule용)의 3가지 형태로 하였다.

가속시험 진행에 대한 Design을 하였고, 3가지(차즈기 티백차, 파우치, 캡슐) 시제품을 제작하였다.



Fig. 51: 가속시험에 사용한 항온항습기 (1층 차즈기 티백, 2층 차즈기 파우치, 3층 차즈기 capsule 순)



Fig. 52: Deep-Freezer에 보관된 1주별 3가지 시제품

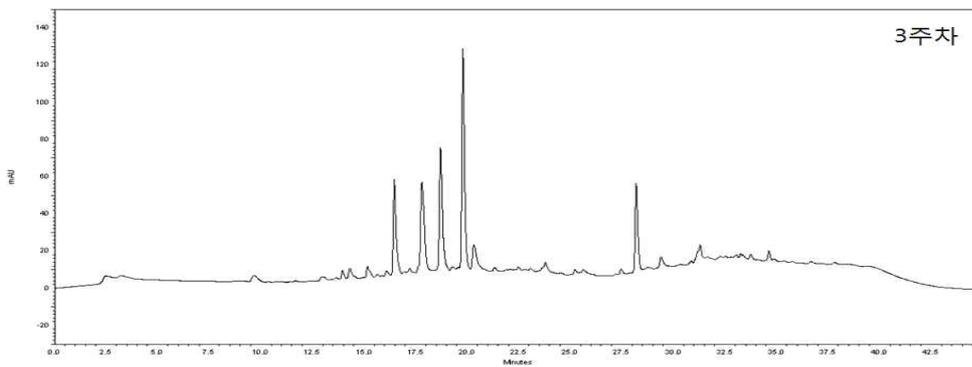
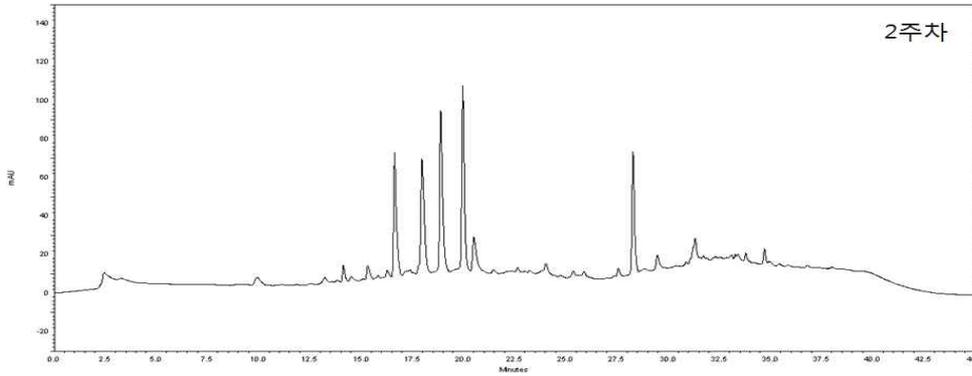
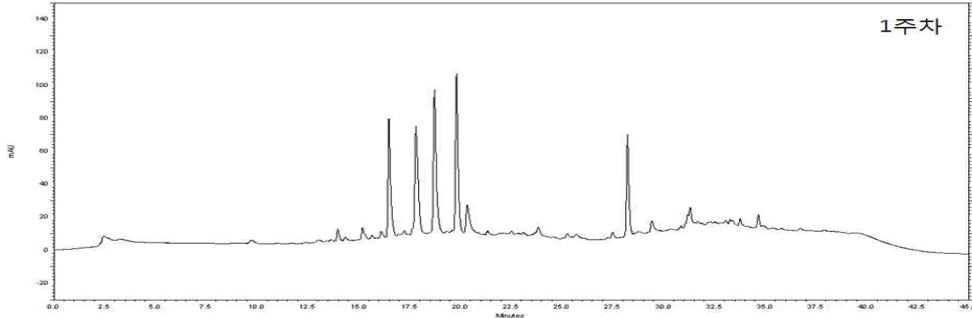
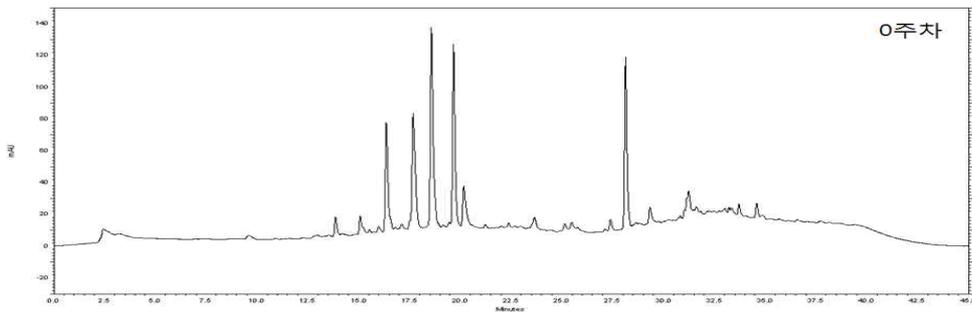
Capsule 제형은 HPLC Methanol에 녹여 Sampling을 하였고 파우치 제형은 1ml을 옮겨담았으며 티백은 100℃의 물에 3분동안 추출하여 추출물을 HPLC로 분석하였다(아래 사진).

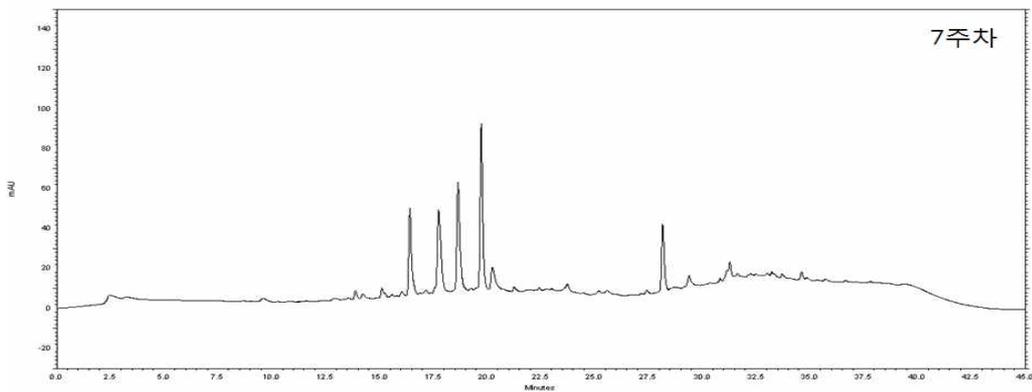
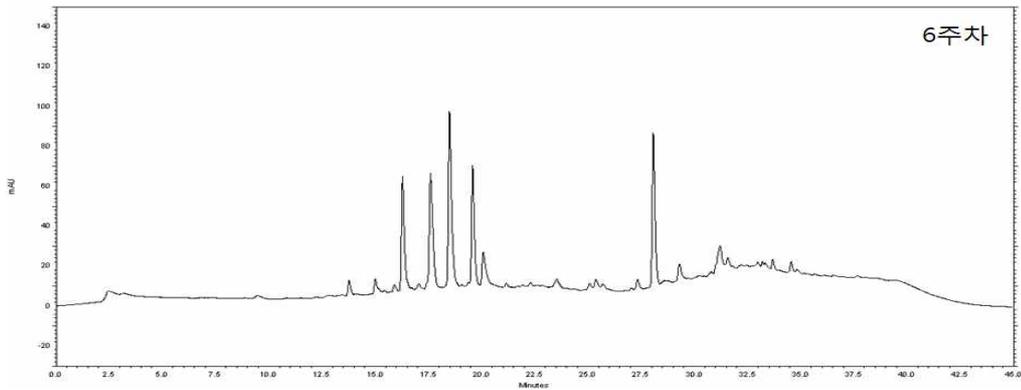
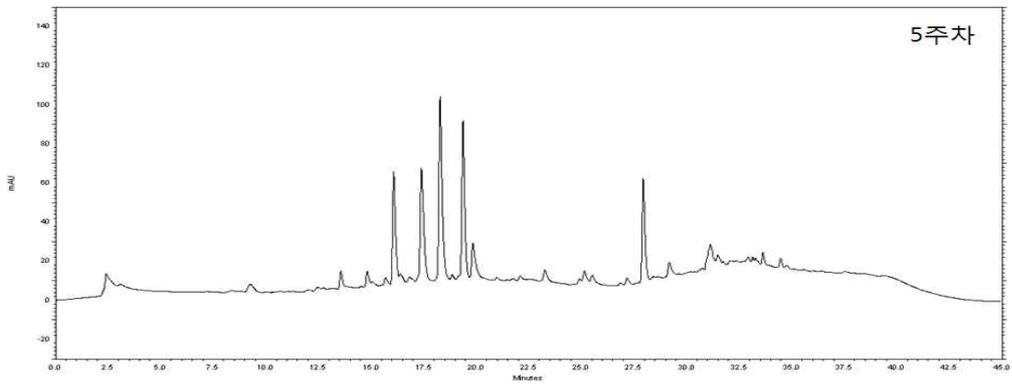
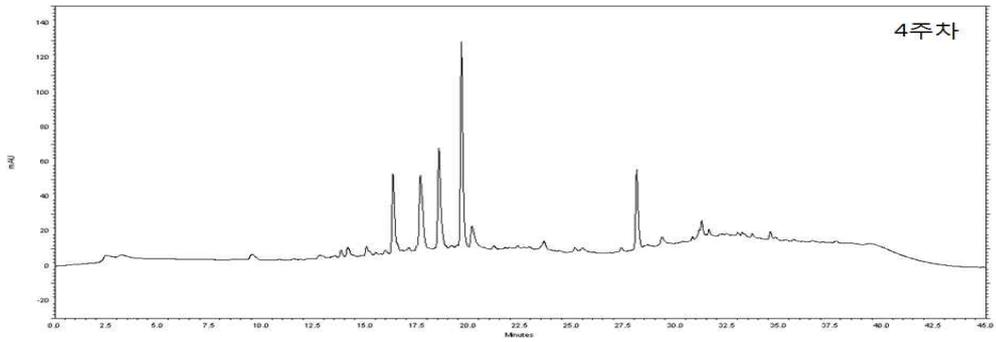


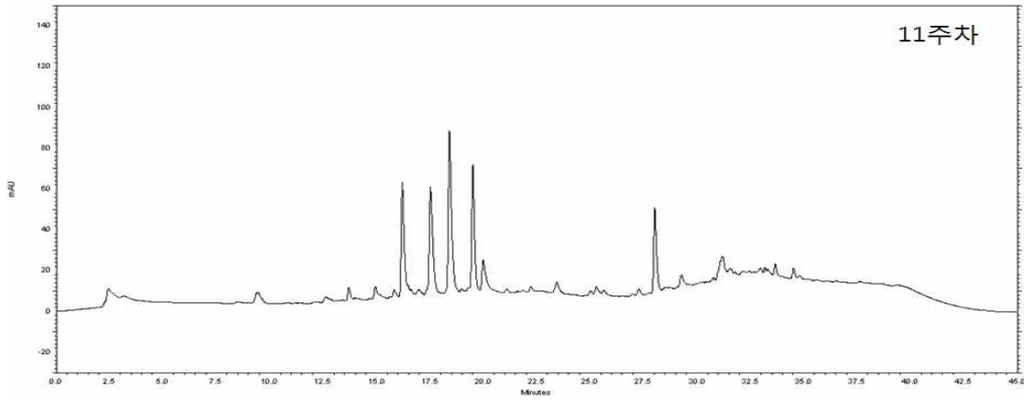
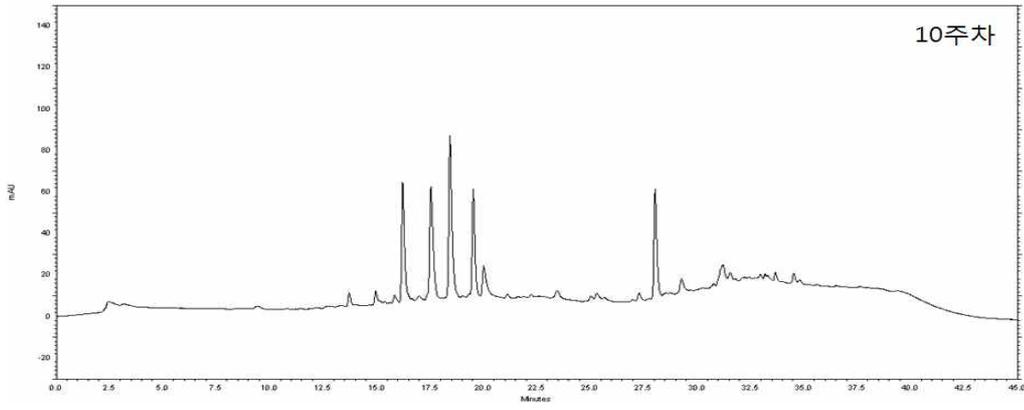
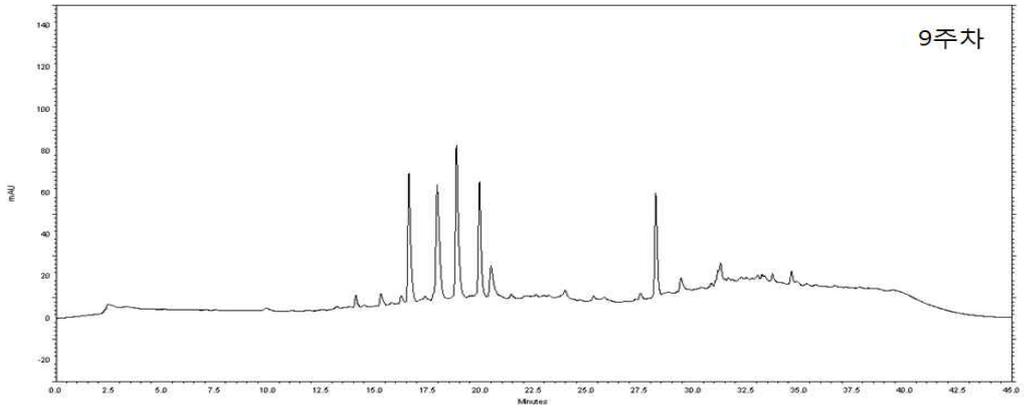
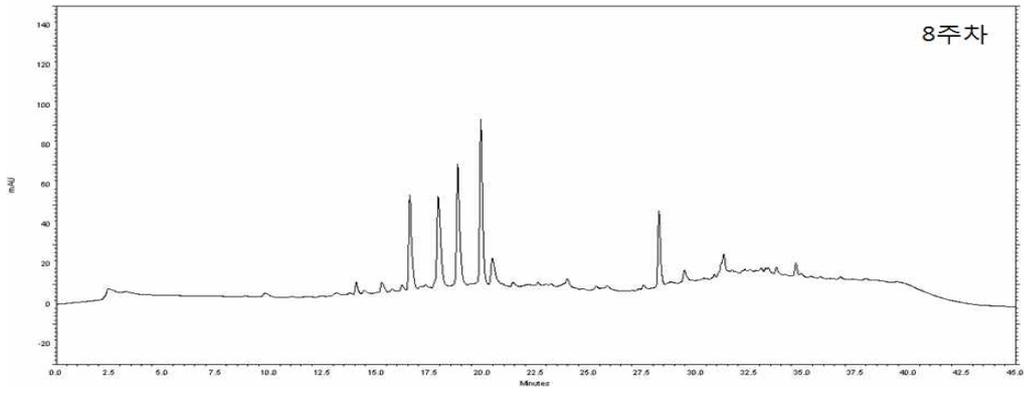
Fig. 53: 차즈기 티백 추출(좌) 및 HPLC sampling(우)

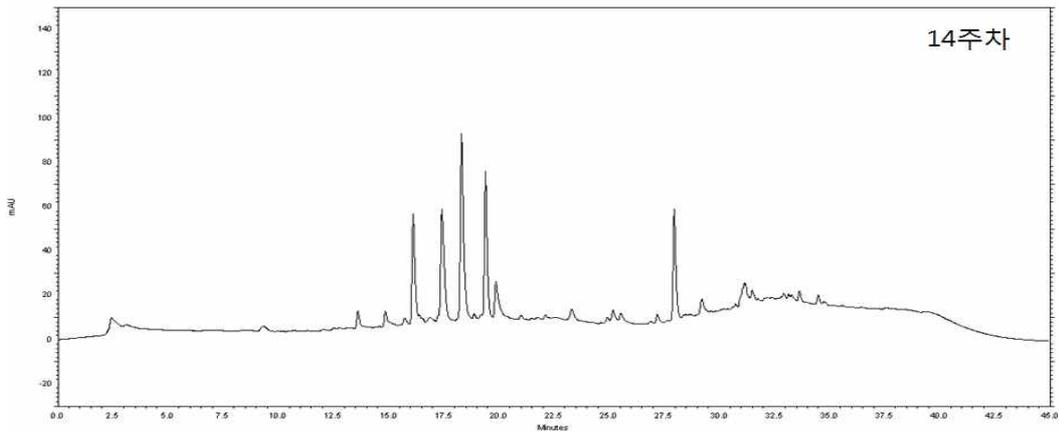
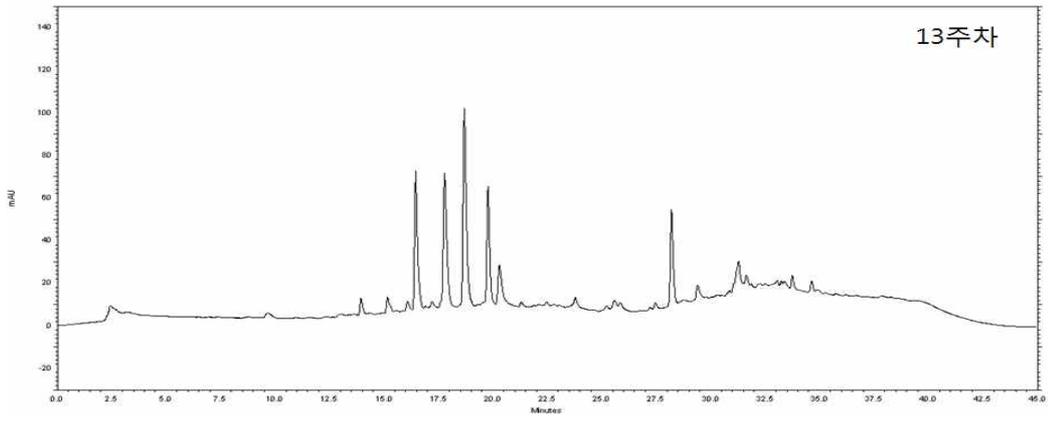
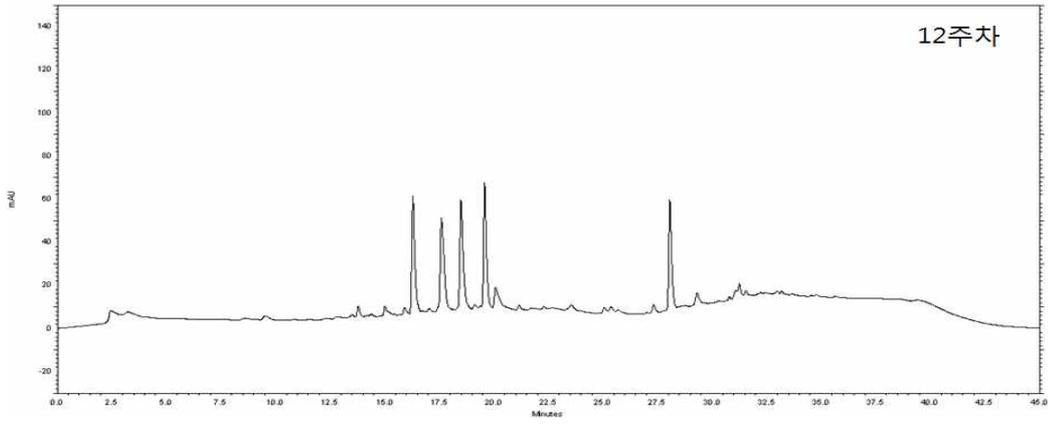
(가) 차즈기 차 제조에 대한 특허(특허 제 10-1470993호, 차즈기차, 이의 제조방법, 차즈기차 추출물을 포함하는 음료조성물, 및 이의 제조방법)의 내용에 따라 차즈기 차에 대한 1주별 Sample을 확보하였으며, Sampling을 완료하였다.

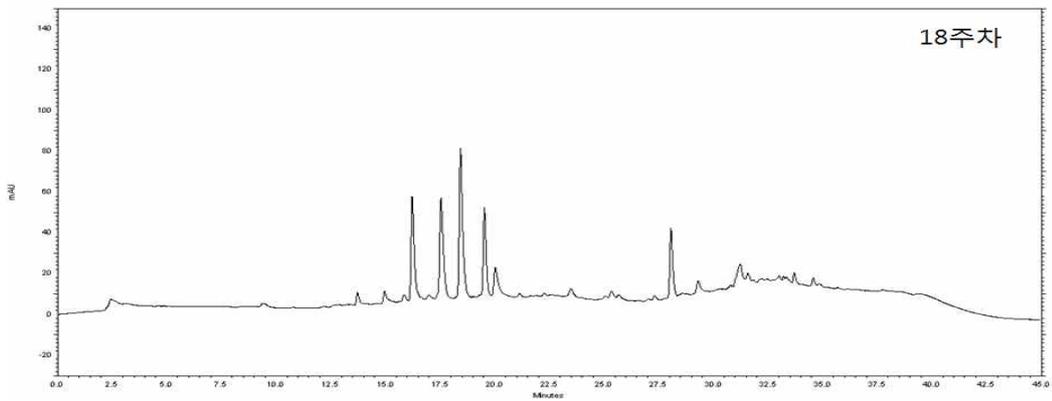
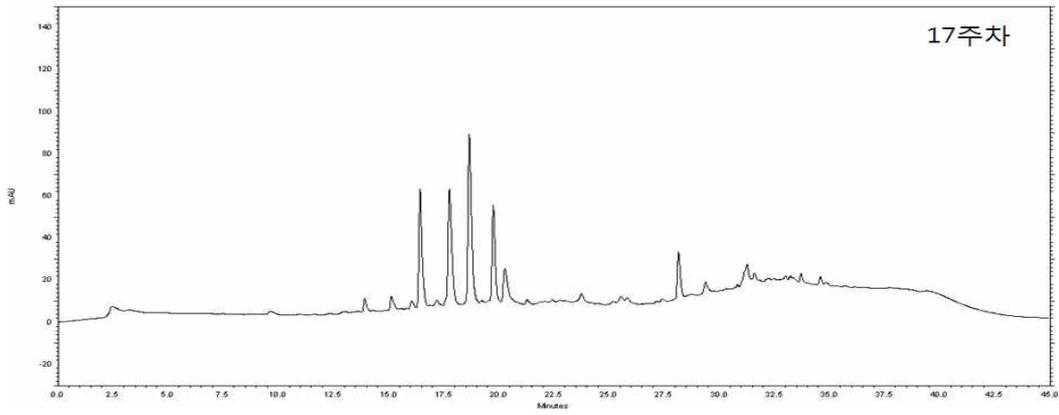
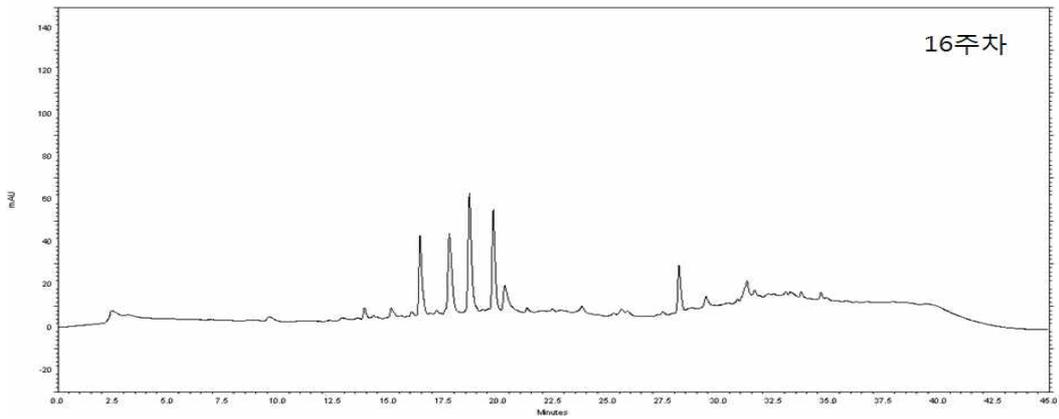
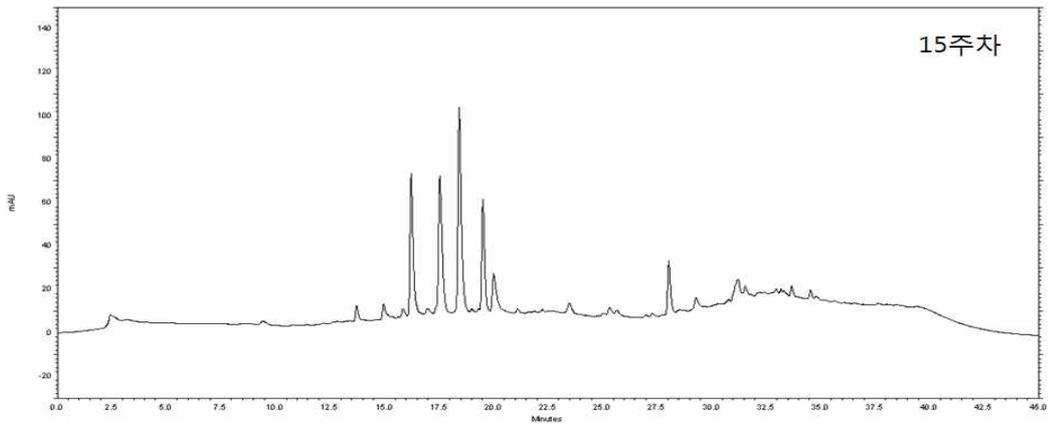
(나) 파우치 형태의 차즈기를 포함한 천연물을 열수추출한 음료 제조하여 1주별 Sample을 총 16개 확보하였으며, Sampling을 완료하였다.

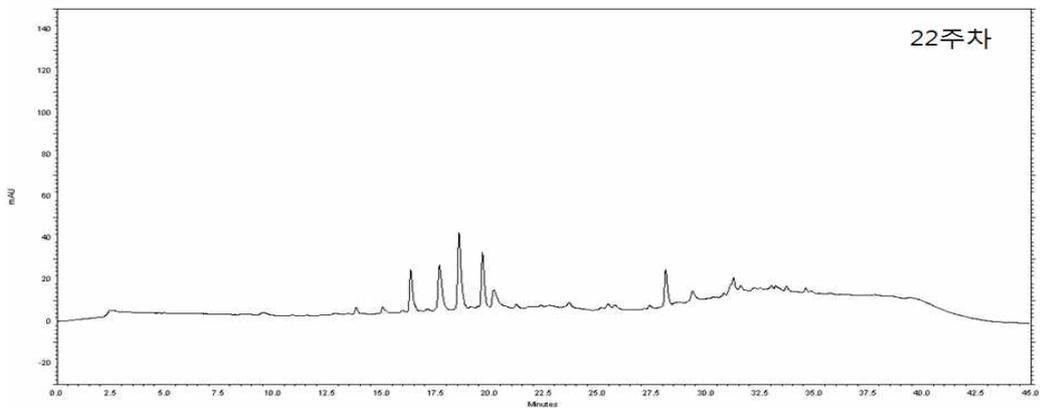
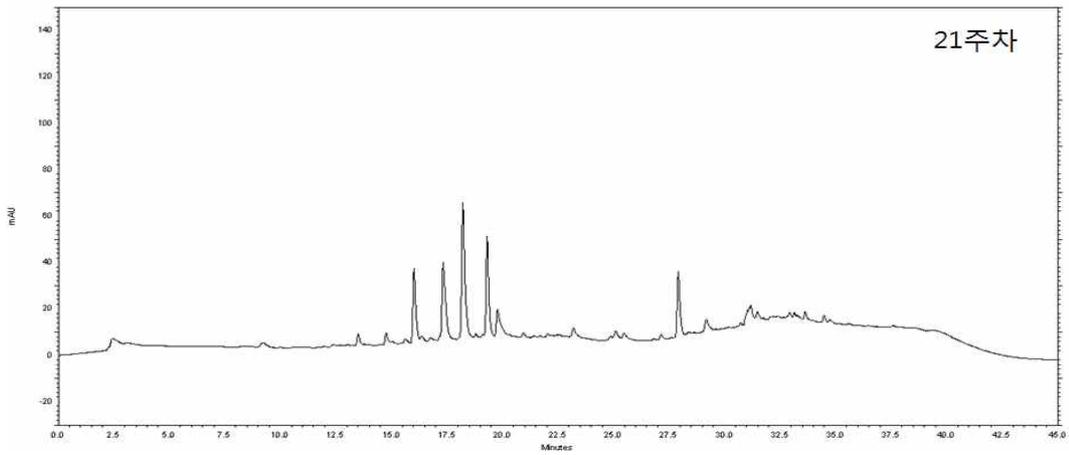
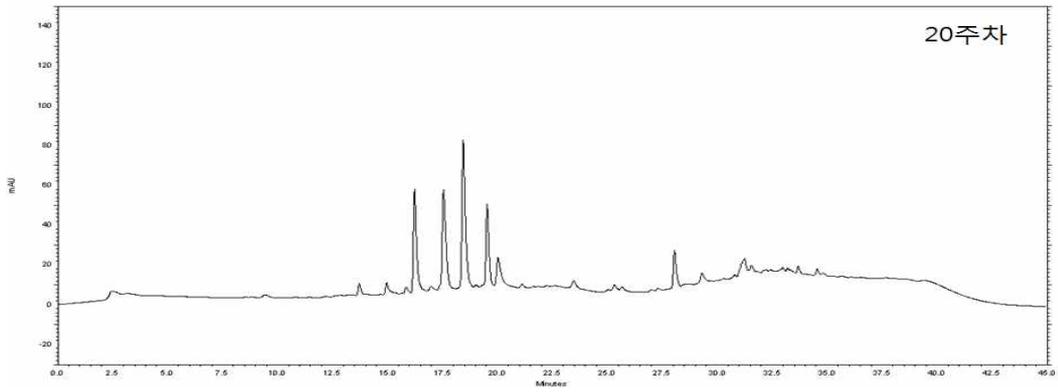
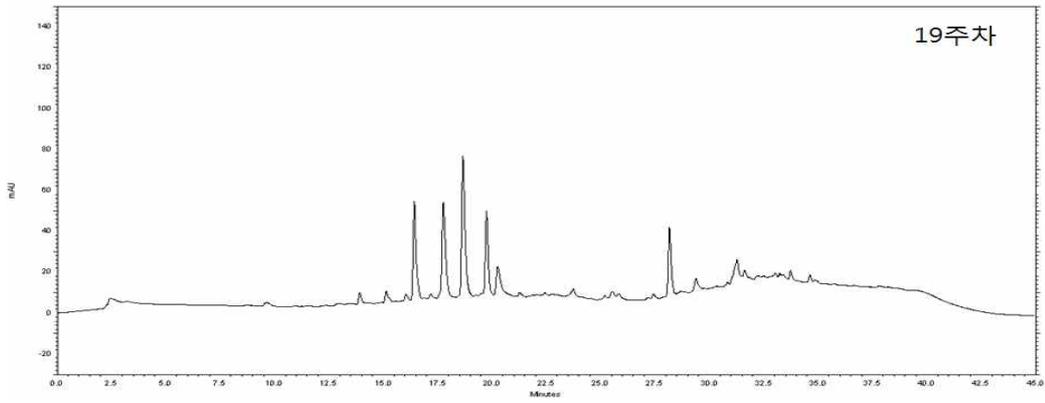












**Fig. 54: HPLC를 이용한 주차별 차즈기 티백 추출**

retention time 28분대의 peak가  $\alpha$ -asarone이며 이 데이터를 통하여 본 제품의 안정성 평가를 진행하였다.

**Table 25: Contents of  $\alpha$ -asarone accelerated test sample**

시험항목 \ 기간	최초	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월
함량(mg/ml)	14.56 ( $\pm 0.3$ )	14.46 ( $\pm 0.24$ )	13.39 ( $\pm 1.09$ )	13.03 ( $\pm 0.5$ )	12.88 ( $\pm 1.35$ )	12.36 ( $\pm 1.2$ )	10.57 ( $\pm 0.33$ )

본 시험은 장기보존시험의 저장조건을 벗어난 단기간의 가속조건이 제품 등의 안정성에 미치는 영향을 평가하기 위한 시험이다. 6 개월 동안 실험이 진행되었으며, 각 실험기간 동안 분석한 시료의  $\alpha$ -asarone의 함량은 평균 13.04 mg/ml이고 6개월의 가속시험을 통한 본 제품의 안정성 평가 결과 12개월의 유통기한으로 설정이 가능하였다.

**(10) 시제품 제작-제형연구(붕해도 실험)**

붕해도 측정 : 3가지 시제품 중 캡슐형태는 제형연구를 위해 제형을 선정하였고, 시제품을 만들었다. 항온조를  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 가열하여, 1 캡슐 당 차즈기 시료 200mg 또는 400mg, 부형제 Cellulose 50, 75, 100mg을 넣고, 1분간에 40rpm으로 왕복, 진폭 53~57 mm 상하로 20분간 운동하였다.

시험기 비커에 넣는 시험액의 양은 시험기가 가장 위로 올라왔을 때 시험기의 망면이 액면 아래로 15mm이상 떨어지도록 하고, 가장 아래로 내려갔을 때 비커의 바닥으로부터 25mm 이상으로 시험기가 완전히 잠기지 않도록 하며 이 후 녹은 캡슐과 남은 캡슐을 확인하였다.



**Fig. 55: 붕해도 실험 예시**



**Fig. 56: 붕해도 실험 제형 연구를 위한 6가지 캡슐형태**

붕해도 실험을 진행하여 시제품 제작에서 제형연구를 하고 있으며 최적화 된 시제품 제작을

위해 연구를 진행 중에 있다.

제조된 차즈기 파우더를 캡슐로 가공하였을 때의 적합성을 확인하기 위하여 제형연구를 진행하였다.

6가지 캡슐 형태로 봉해도 실험을 위의 조건으로 진행 후 캡슐의 수축율을 측정하였다. 수축율은 아래와 같은 계산식으로 계산하였다.

$$\text{수축율}(\%) = 1 - ((\text{침가하기 전의 캡슐크기}(\text{cm}) - \text{침가한 후의 캡슐크기}(\text{cm})) / \text{침가하기 전의 캡슐크기}(\text{cm})) \times 100$$

제조한 캡슐 내에 존재하는 a-asarone의 함량의 비율을 측정하고자 캡슐의 봉입효율을 측정하였다. 제조된 차즈기 파우더를 하루동안 방치시켜 침전시킨 후 Whatman filter paper를 이용하여 침전된 잔여물을 여과하고 회전진공농축기를 사용하여 완전히 농축한 후 재 용해한 후 HPLC로 분석하였다.

캡슐로 코팅한 차즈기 파우더의 봉해도를 측정한 결과 차즈기 시료가 400mg들어가고 cellulose가 50mg들어간 조건이 가장 빠르게 봉해되는 반면, cellulose의 양이 증가할수록 캡슐 내부의 약물 방출이 지연되었다. 이는 37도의 온도에서 차즈기 파우더 형태가 녹게 되면서 캡슐 내부의 시료 방출이 빠르게 이루어진 것으로 추측되었다.

**Table 26: 조건에 따른 캡슐로 코팅된 차즈기 파우더의 녹은 캡슐의 양 (%)**

Sample (mg)	cellulose	brix	녹은 캡슐의 비율 (%)
200	50	8	43.08±1.87
200	75	8	42.39±1.20
200	100	8	33.38±2.22
400	50	8	50.35±1.23
400	75	8	46.29±0.89
400	100	8	40.88±0.54

### (11) 관능평가

차즈기 티백에 대한 관능적 특성 평가는 랜덤화 완전블록 실험법에 따라 패널요원 1인이 무작위로 배치된 티백과 파우치에 대한 평가를 하도록 한다. 시료의 특성 평가는 향, 미, 목넘김 순으로 평가 한다. 평가에 참여하는 패널요원들에게는 평가 1시간 전부터 물 이외의 음료나 음식물 섭취를 피하도록 하고, 향이 진한 화장품의 사용을 금하도록 한다.

## 차즈기 제품에 대한 관능설문조사표

평가일 2015. 06. 00.

본 연구소에서는 콜레스테롤 감소 건강기능식품으로 개발 중인 차즈기 차 제품에 관한 관능설문검사를 실시하고자 합니다. 참여해주신 분들의 의견을 수렴하여 제품개발에 반영하고자하오니 많은 협조를 부탁드립니다.

1. 일반현황

성명		알레르기 유무 (보유알레르기)	
연령	만	세	성별 남 / 여

\* 음료 형태의 제품을 시음 전, 후에 향과 맛에 대한 평가(A, B, 2가지 type)

2-1. 귀하는 차즈기 차의 향의 느낌이 어떠하십니까?

매우 싫다 (1)	싫다 (2)	보통이다 (3)	좋다 (4)	매우 좋다 (5)

2-2. 귀하는 차즈기 차의 맛이 어떠하십니까?

매우 싫다 (1)	싫다 (2)	보통이다 (3)	좋다 (4)	매우 좋다 (5)

2-3. 귀하는 차즈기 차의 목넘김이 어떠하십니까?

매우 싫다 (1)	싫다 (2)	보통이다 (3)	좋다 (4)	매우 좋다 (5)

3. 콜레스테롤 감소로 효과가 있다면 귀하는 차즈기 차 제품을 사용하시겠습니까?

- 1) 네. (4-1 문항으로)
- 2) 아니오. (4-2 문항으로)

3-1. 질문4번에서 “네.”를 선택하셨다면 주변 지인에게 이 제품을 추천하시겠습니까?

- 1) 네.
- 2) 아니오.

3-2. 질문 3번에서 “아니오.”를 선택 하셨다면 간단한 이유를 적어주세요.

4. 귀하의 취향에 따라 좋거나, 싫은 점에 대해 주관적인 의견을 작성하여 주십시오. 또한 향을 개선한다면 추천해주십시오.

※ 귀하께서 작성하신 본 조사의 내용은 비밀이 보장되며 제품 품질향상을 위한 통계목적 이외에는 사용하지 않음을 알려 드립니다.

“끝까지 설문에 답해 주셔서 대단히 감사합니다.”

특허와 같은 방법으로 제조된 덩음 공정과 비빔공정을 7차로 진행한 차즈기 차의 관능검사 조사 대상자는 총 23명으로 남성이 13명(56.5%), 여성이 10명(43.5%)이었으며 이들의 차 섭취 빈도는 '주 1~2회 이하'가 28.7%로 가장 높았고, '주 3회 이상'이 22.4%로 나타났다. 조사 대상자의 성별에 따른 관능검사 결과를 확인하였는데, 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

평가 항목은 향, 맛, 목넘김 총 3개 항목에 대해 각 5점 척도로 평가하였다. 향 항목에서는 차 섭취를 자주 이용하지 않는 '주 1~2회 이하' 군은 '주 3회 이상' 군보다 향에 더 민감한 결과를 보여 평균 평점 2.7점이었고, '주 3회 이상' 군은 평점 3.4점으로 조금 더 높았다. 맛과 목넘김의 항목에서는 '주 1~2회 이하' 군과 '주 3회 이상' 군에서 별다른 차이점이 없었으며 맛 항목에서 평점 3.6점, 목넘김 항목에서 평점 4.1점으로 가장 높았다.

#### (12) 제품화에서 향의 개선을 위한 차즈기차와 수국차의 혼합차 개발

○ 관능평가 결과에 따라 향의 평점이 제일 낮아 향과 맛의 개선을 위해 11가지 비율로 섞어서 개발하였다. 제조 후 향산화 활성이 우수하여 시너지 효과를 나타내는 차가 있는지 확인해보았고 HPLC 면적값 비교를 통하여 성분 추출이 많이 되는 비율도 확인을 하였다.

Table 27: 차즈기:수국 비율별 ABTS

차즈기:수국	1차	2차	3차	평균	억제율 (%)
0:10	0.675	0.637	0.653	0.655±0.005	57.03946
1:9	0.989	0.979	0.968	0.979±0.028	34.36843
2:8	0.914	0.91	0.905	0.910±0.009	39.20149
3:7	0.863	0.875	0.848	0.862±0.011	42.54028
4:6	0.572	0.577	0.564	0.571±0.008	62.92318
5:5	0.782	0.781	0.788	0.784±0.014	48.02708
6:4	0.795	0.766	0.777	0.779±0.004	48.33061
7:3	0.775	0.771	0.773	0.773±0.009	48.77422
8:2	0.954	0.95	0.958	0.954±0.012	36.09619
9:1	1.15	1.151	1.151	1.151±0.016	22.3208
10:0	1.089	1.071	1.098	1.086±0.009	26.85034

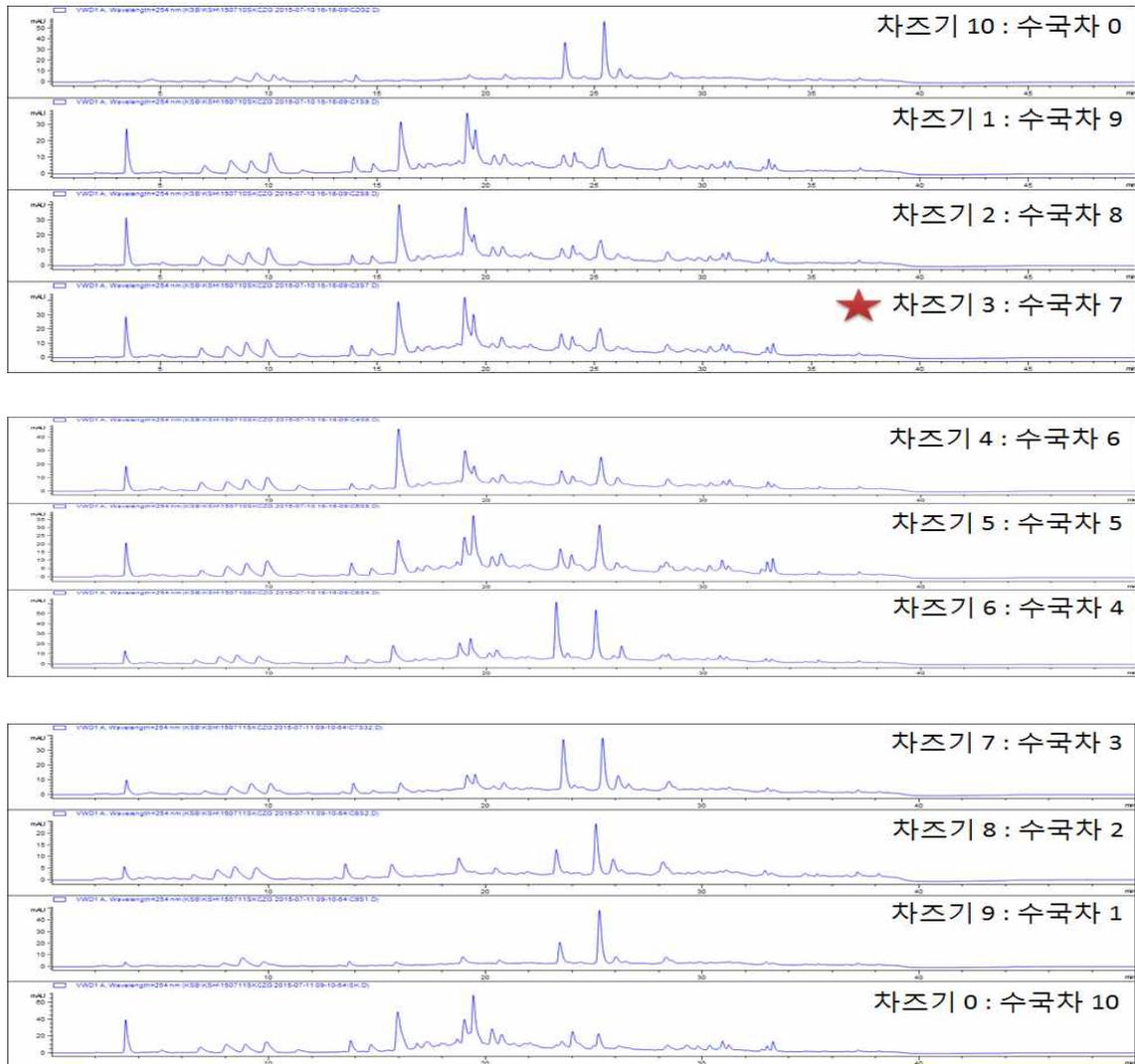


Fig. 57: 차즈기 수국 혼합차의 HPLC 성분분석

차즈기 수국차의 추출물은 HPLC(Agilent technologies(Germany) 1200, column : ZOBAX SB-C18 4.6 ×150mm at 30°C. The mobile phase consisted of two solvents: trifluoroacetic acid(0.1%, V/V) in water (A) and methanol (B). A linear gradient starting with 0% B was installed to reach 10% B at 10min, 30% B at 15min, 50% B at 25min, 100% B at 25 to 35 min. The flow rate was 0.7ml/min and the injection volume 10ul. detector is 254nm)로 분석한 결과이다.

Table 28: 차즈기:수국 비율별 ABTS

비율		전체면적값
차즈기	수국	
10	0	2076.31
9	1	1682.47
8	2	1482.71
7	3	2576.14
6	4	3906.25
5	5	3862.47
4	6	3669.26
3	7	4221.38
2	8	3636.05
1	9	3405.47
0	10	5884.12

분석한 차즈기수국차의 비율별 HPLC 전체면적 값을 확인한 결과 차즈기 0 : 수국차 10의 비율의 전체면적 값이 가장 높게 나왔고 차즈기가 들어간 비율에서는 차즈기 3 : 수국차 7의 비율이 가장 높았다.

**(13) 차즈기 차 제조공정과정 (특허 제 10-1470993 호) 및 시제품 제작**

○ 일반 시판되고 있는 일반 차의 제조 방법 : 찻잎에 대해 약 5-20배 중량의 물을 첨가한 다음, 80-120℃에서 6-15시간 동안 열수 추출 한다.

○ 본 과제에서 개발 된 차즈기 차 제조 공정 방법

① 전처리 공정 : 차즈기 잎을 시들거나 변색된 잎 부분을 선별하여 제거한다. 선별한 차즈기 잎을 물에 깨끗하게 세척하고 체반에 걸러 물을 뺀 후 자연 건조 시키고, 이를 절단기를 이용하여 0.5 - 1.5 cm 크기로 균일하게 절단한다.

② 덥음 및 비빔 공정 : 차즈기 잎을 가마솥이나 원통덥음솥에 넣고 200-250℃의 온도에서 1-5분간 덥는 덥음 공정과 덥음 된 차즈기 잎을 1-5분간 비비는 비빔 공정을 7차 반복한다.

③ 포장 공정 : 덥음 공정과 비빔 공정을 7차 반복한 차즈기 잎을 실온으로 냉각한 후 불순물을 제거하고 포장하거나, 분쇄기를 사용하여 차즈기 잎을 100-200 mesh가 되도록 분쇄한 후 티백 제조기를 이용하여 티백용으로 포장하는 포장공정을 진행한다.

○ 본 특허에서는 다양한 제조공정을 거친 후 그에 따른 향산화 차이를 확인하여 최종 조건을 확립하였다.

① 150℃에서 1-4차 덥음 후 250℃의 온도에서 5-7차 덥음 한 차즈기 차

차즈기 잎	Polyphenol 함량 (g/100g)	Flavonoid 함량 (g/100g)	항산화능 (%)
1차 덤프	0.020	0.234	16.48
2차 덤프	0.031	0.328	19.67
3차 덤프	0.013	0.245	11.36
4차 덤프	0.063	0.474	31.93
5차 덤프	0.067	0.492	36.09
6차 덤프	0.071	0.505	38.78
7차 덤프	0.241	1.349	73.13

② 250℃에서 1-4차 덤프 후 150℃의 온도에서 5-8차 덤프 한 차즈기 차

차즈기 잎	Polyphenol 함량 (g/100g)	Flavonoid 함량 (g/100g)	항산화능 (%)
1차 덤프	0.066	0.443	34.00
2차 덤프	0.124	0.859	54.57
3차 덤프	0.093	0.703	35.32
4차 덤프	0.118	0.766	44.32
5차 덤프	0.072	0.422	29.43
6차 덤프	0.136	0.818	53.53
7차 덤프	0.266	1.464	88.71
8차 덤프	0.199	1.078	77.77

③ 150℃의 온도에서 1-8차 덤프 한 차즈기차

차즈기 잎	Polyphenol 함량 (g/100g)	Flavonoid 함량 (g/100g)	항산화능 (%)
1차 덤프	0.049	0.384	38.09
2차 덤프	0.123	0.738	51.25
3차 덤프	0.055	0.339	20.22
4차 덤프	0.084	0.453	13.85
5차 덤프	0.054	0.321	40.17
6차 덤프	0.027	0.290	22.65
7차 덤프	0.065	0.453	18.56
8차 덤프	0.054	0.408	25.42

④ 250℃에서 1-4차 덤프 한 차즈기 차

차즈기 잎	Polyphenol 함량 (g/100g)	Flavonoid 함량 (g/100g)	항산화능 (%)
1차 덫음	0.054	0.370	18.56
2차 덫음	0.049	0.422	25.42
3차 덫음	0.084	0.453	31.65
4차 덫음	0.135	0.734	51.45

○ 위의 제조공정을 거쳐 250℃에서 1-4차 덫음 후 150℃의 온도에서 5-8차 덫음하는 조건을 이용하여 차즈기 차를 제품화로 선택하였다. 시제품은 바로 생산소비가 가능한 차를 주제로 진행하였고 연구 성과는 이 차를 섭취 시 기대되는 효과로 연계가 가능하다.

○ 주로 연구한 비극성 α-asarone을 주 성분으로 하는 제품은 현재 전임상 연구(지표성분 분석, 후보소재의 활성 및 효능검증, 최종 선택 제형 기준 설정)가 진행이 되어 있으므로 향후 임상연구를 통하여 건강기능식품 소재로 활용가치가 충분하다고 사료된다.

○ 지관통 안에 파우치 형식으로 들어있는 차즈기차 시제품을 제작하였다. 중량은 25g으로 되어있으며 디자인은 2가지로 제작하였다.



고급형 상자 안에 티백 형식으로 들어있는 차즈기차 시제품을 제작하였다. 티백 당 중량은 1.5g으로 이루어져있으며 기존 시판되는 종이형식으로 포장되어있는 티백과 달리 내용물을 확인할 수 있는 투명 비닐 소재로 포장하여 제품의 차별성을 두었다.



고급형 상자 안에 대용량 티백 형식으로 들어있는 차즈기차 시제품을 제작하였다. 티백 당 중량은 10g으로 이루어져있으며 기존 가정에서 식수로 이용하는 보리차 대용의 제품이 될 수 있을 것으로 예상하였다.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 연구개발의 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
1차년도 (2012)	<b>제1세부과제:</b> 고콜레스테롤혈 증으로 인한 경화성 혈관질환 개선을 위한 차즈기 소재 개발	경화성 혈관질환의 초기단계에서 나타나는 거품세포의 콜레스테롤 유출에 대한 차즈기 소재의 효능 규명	100	▪ 차즈기의 유효성분이 콜레스테롤이 축적된 거품세포의 형성을 감소시키는 효과-지질성분 염색하여 확인할 수 있는 Oil red O 염색법 사용	
				▪ 거품세포에 축적된 콜레스테롤을 유출하는데 관여하는 ABCA1 및 ABCG1의 단백질 발현 효과 측정	
				▪ 콜레스테롤 부하 검사로 유출된 콜레스테롤의 정량법을 통한 확인	
	<b>제2세부과제:</b> 차즈기 소재의 콜레스테롤 생합성 및 흡수 저해활성 평가	장 내피세포(CaCo-2)를 이용 차즈기 추출물의 콜레스테롤 흡수 저해능 평가	100	▪ 장 내피세포(CaCo2)를 이용 차즈기 추출물의 장 내피세포 세포배양에서 콜레스테롤 흡수 저해능 평가	
				장 내피세포(Caco-2)를 이용 차즈기 추출물의 장 내피세포에서 콜레스테롤 합성 저해능 평가	100
	<b>제1협동과제:</b> 제품의 표준화, 기준규격 설정 및 안정성 평가 및 차즈기 소재의 추출물 및 분획물의 유기화학적인 분석 및 유효성분의 구조 규명	추출, 분획물 확보	100	▪ 추출 및 극성에 따른 분획물 확보	
활성 추출 분획물로부터 유효성분 도출 및 구조 규명				100	▪ n-Hexane, Ethyl acetate, H <sub>2</sub> O 분획물로부터 유효성분 도출 및 구조 규명 중
					▪ 칼럼크로마토그래피(HPLC), TLC 및 MPLC, CPC 등을 사용하여 추출물 분리 중
			▪ LC/MS, NMR( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-NMR, COSY, DEPT, HMQC 및 HMBC) 기기를 사용하여 활성성분의 정확한 구조 동정 중		

2차년도 (2013)	제1세부과제: 고콜레스테롤혈 증으로 인한 경화성 혈관질환 개선을 위한 차즈기 소재 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ApoE KO mouse에서 apoA-1의 생성 및 혈액 내 지질성분 조절 확인</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 동맥경화증의 대표적 동물모델인 apoE KO mouse를 이용하여 동맥경화식이인 Paigen's diet과 농도별 차즈기 추출물을 12주간 경구투여하여 혈청 분리 및 지질 분석과 간에서의 apoA-1생성 정도 확인</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 유출된 콜레스테롤이 LCAT, PLTP 등의 효소 작용으로 인한 HDL 형성 확인</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ HDL의 전구체 형태는 혈장LCAT, PLTP, CETP 등의 효소작용에 의해 HDL과 LDL로 상호 전환되며, 이것을 조절하는 효소들을 ELISA를 이용해 측정함</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 단일 유효 성분을 토대로 cholesterol influx/efflux의 효능 평가</li> </ul>	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 단일 유효 성분을 처리하여 차즈기 추출물과 비교하여 cholesterol influx/efflux에서의 효능을 SR-B1, Oil red O staining, 그리고 ABCA1/G1의 단백질 발현을 통해 확인</li> </ul>
	제2세부과제: 차즈기 소재의 콜레스테롤 생합성 및 흡수 저해활성 평가	Sprague Dawley(SD) 수컷 흰쥐를 이용한 차즈기 추출물의 혈액지질 지표에 대한 영향	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 실험동물은 최적조건에서 예비 사육한 외관상 건강한 평균체중 150±10 g의 Sprague Dawley(SD) 수컷 흰쥐를 난괴법에 의해 10마리씩 6군으로 나누고 4주간 사육</li> <li>▪ 처리군은 음성대조군 (무처리군), 양성대조군 (Atrovastatin) 0.3 mg/kg/day, 차즈기추출물을 10, 30, 100 mg/kg/day로 물에 녹여 존데를 이용하여 매일 경구 투여</li> </ul>
			100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 혈액생화학측정기를 이용하여 혈청내의 중성지방 (Triglyceride), 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤을 측정</li> <li>▪ 간독성의 표지자인 GOT, GPT 신장독성의 표지자인 BUN을 측정하여 비교분석</li> </ul>
			원료의 구성성분 Pattern 분석	100

	<b>제1협동과제:</b> 제품의 표준화, 기준규격 설정 및 안정성 평가 및 차즈기 소재의 추출물 및 분획물의 유기화학적 분석 및 유효성분의 구조 규명	활성 분획물의 분리 및 구조 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>active-principle에 의거한 활성성분 추적 및 분리</li> </ul>
		활성 분획물(Hexane)의 대량 추출법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>RSM (반응표면분석)을 활용한 최적추출 조건</li> <li>Sonication 추출 조건(시료 량 10g에 온도, 시간, 용매% 달리함), 침출 추출 조건(시료 량 10g에 온도, 시간, 용매% 달리함), reflux 추출 조건(추출 온도 70℃에서 시료 량, 시간, 용매% 달리함)으로 실시</li> <li>각 세부과제에 시료 제공</li> </ul>
3차년도 (2014)	<b>제1세부과제:</b> 고콜레스테롤혈증으로 인한 경화성 혈관질환 개선을 위한 차즈기 소재 개발	산화LDL의 oxysterol로의 전환으로 인한 세포지질독성으로 매개된 세포사멸 억제 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>7β-hydroxycholesterol (oxysterol)을 대식세포에 처리하여 세포의 지질독성으로 인한 세포사멸을 MTT assay를 통해 확인하고, TUNEL assay로 시각적으로 확인함</li> </ul>
		소포체 스트레스를 통한 동맥경화증 관련 바이오마커의 발현 억제에 대한 회복 효능 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>동맥경화증과 관련된 다양한 바이오마커의 단백질 발현을 소포체 스트레스의 대표적 유도물질인 tunicamycin을 처리하여 감소시키고, 이것의 회복능을 확인하기 위해 차즈기 추출물을 처리하여 western blot으로 확인함</li> </ul>
		소포체 스트레스로 인한 세포사멸 억제 기전 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>소포체 스트레스를 확인할 수 있는 대표적인 바이오마커인 ATF6, phospho-IRE1α, phospho-PERK의 단백질 발현을 확인하고, 그로 인한 세포사멸에 대한 다양한 신호전달 기전에 해당하는 바이오마커를 western blot, immunocytochemistry 등으로 측정함</li> </ul>
		실험동물에서 reverse cholesterol transport에 대한 관련 효소의 활성도 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>ApoE KO mouse의 혈액을 채취 및 혈장을 분리하여 RCT와 관련된 다양한 효소인 PLTP, LCAT, CETP를 ELISA를 통해 확인함</li> </ul>
				<ul style="list-style-type: none"> <li>간조직에서 homogen과 원심분리법을 통한 microsome</li> </ul>

<b>제2세부과제:</b> 차즈기 추출물의 세포 및 동물모델에서 혈중 콜레스테롤 저하 효능 평가	in vivo 실험에서 간 조직의 콜레스테롤 대사 효소 활성 측정	100	분리 ▪ 분리한 microsome으로 mevalonate를 이용한 콜레스테롤 합성 효소인 HMG-CoA reductase의 활성 측정
		100	▪ 분리한 microsome으로 cholesterol oleate를 채취하여 scintillation을 이용한 콜레스테롤 합성 효소인 ACAT의 효소 활성 측정
<b>제1협동과제:</b> 제품의 표준화, 기준규격 설정 및 안정성 평가 및 차즈기 소재의 추출물 및 분획물의 유기화학적인 분석 및 유효성분의 구조 규명	제품의 대량생산공정에 맞는 시스템 구축 및 공정 개발	100	▪ Validation을 통하여 지표성분 및 유효성분 최대추출 조건의 대량생산공정 확립
	제품의 안정성 평가-가속시험	100	▪ 총 6개월의 1주별 50℃, 60% 습도에서의 Sample 확보 ▪ 6개월의 가속시험을 통한 유통기한 설정
	시제품 제작-제형연구 (붕해도 실험)	100	▪ 캡슐 형태별 제형 연구 및 유효성분의 적정 약물방출시간 확인 ▪ 캡슐에 포함될 적정 시료 용량 확인
	관능평가	100	▪ 23명의 조사대상자를 상대로 관능평가를 진행하여 통계치를 측정하였고 평점이 낮은 항목에 따른 개선 방법을 제시

## 2. 관련분야 기술발전 기여도

1) SCI 논문 “Park et al., Sage weed (Salvia plebeia) extract antagonizes foam cell formation and promotes cholesterol efflux in murine macrophages, 2012, Int J Mol Med, 30(5):1105-1112.”을 게재함으로써 배암차즈기 추출물의 대식세포에서 거품세포 형성 및 콜레스테롤의 유출 효능에 대한 죽상동맥경화증 예방을 목표로 하는 새로운 기능성 소재 발굴

2) SCI 논문 “Park et al., Purple perilla extracts allay ER stress in lipid-laden macrophages, 2014, PLoS One, 9(10):e110581.”을 게재함으로써 차즈기 추출물의 소포체 스트레스 억제능을 통한 소포체스트레스와 관련된 경화성 치매와 혈관성 질환을 타겟으로 하는 신약소재 발굴

- 3) SCI 논문 “Park et al., Purple perilla extracts with  $\alpha$ -asarone enhance cholesterol efflux from oxidized LDL-exposed macrophages, 2015, Int J Mol Med, 35(4):957-965.”을 게재함으로써  $\alpha$ -asarone을 포함한 차즈기 추출물의 거품세포에서의 cholesterol efflux를 촉진하는 새로운 지질개선 소재 발굴 및 기능성 식품소재 개발 기여
- 4) SCI 논문 “Park et al., Alpha-asarone alleviates ER stress-mediated apoptosis in  $7\beta$ -hydroxycholesterol-challenged macrophages 논문발표는 산화 LDL뿐만 아니라 더 산화된 형태의 oxysterol을 통한 대식세포에서의 소포체 스트레스를 매개로 한 세포사멸을 억제하는 alpha-asarone 물질의 신기능성 정보 공유
- 5) 특허 10-2015-0129495 ‘차즈기 추출물 또는 알파-아사론을 함유하는 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물 및 치료용 약학 조성물’ 출원을 통하여 알파-아사론을 함유하는 차즈기 추출물의 죽상동맥경화증 예방용 조성물로서의 기능성 식품소재와 신약소재 발굴 및 기술이전
- 6) 특허 제 10-1470993호 ‘차즈기차, 이의 제조방법, 차즈기차 추출물을 포함하는 음료 조성물, 및 이의 제조방법’ 출원 및 등록을 통하여 차즈기 차의 제조 방법에 따른 항산화 향상 기술을 발명하였고, 새로운 제조방법 기술 발전에 기여
- 7) SCI 논문 “Paek et al., Rapid identification of aldose reductase inhibitory compounds from *Perilla frutescens*, 2013, Biomed Res Int, 2013:679463.”을 게재함으로써 분리, 분석 및 활성 기술에 대한 정보 공유
- 8) 특허 2015-0077595 ‘차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법’ 출원을 통하여 차즈기 추출물 내에서 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물을 최대로 추출시키는 방법을 발명하였고, 지표물질 및 유효물질 추출 방법에 대한 기술 발전에 기여

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구개발 성과

#### 1) 논문

- Park et al., Sage weed (*Salvia plebeia*) extract antagonizes foam cell formation and promotes cholesterol efflux in murine macrophages, 2012, Int J Mol Med, 30(5): 1105-1112.
- Paek et al., Rapid identification of aldose reductase inhibitory compounds from *Perilla frutescens*, 2013, Biomed Res Int, 2013: 679463.
- Park et al., Purple perilla extracts allay ER stress in lipid-laden macrophages, 2014, PLoS One, 9(10): e110581.
- Park et al., Purple perilla extracts with  $\alpha$ -asarone enhance cholesterol efflux from oxidized LDL-exposed macrophages, 2015, Int J Mol Med, 35(4):957-965.

#### 2) 특허

- 출원번호 : 10-2013-0007899, 차즈기차, 이의 제조방법, 차즈기차 추출물을 포함하는 음료 조성물, 및 이의 제조방법.
- 등록번호 : 10-1470993, 차즈기차, 이의 제조방법, 차즈기차 추출물을 포함하는 음료 조성물, 및 이의 제조방법.
- 출원번호 : 10-2015-0077595, 차즈기 추출물을 포함하는 콜레스테롤 대사 관련 혈관질환 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법.
- 출원번호 : 10-2015-0129495, 차즈기 추출물 또는 알파-아사론을 함유하는 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물 및 치료용 약학 조성물

#### 3) 인력양성

- 본 연구과제에 참여를 통해 차즈기의 추출 및 유효 성분 분리법과 항동맥경화성 및 콜레스테롤 저하에 대한 기능성 평가 기술에 대한 전문 인력으로 배출

##### -박사 2명

강민경-한림대학교 식품영양학과 BK21플러스 post doc. 취업

김정현-한림대학교 천연의학연구소 연구원 취업

##### -석사 7명

김민수-(주)휴젤 연구원 취업

김윤호-한림대학교 식품영양학과 박사과정 진학

박신혜-한림대학교 식품영양학과 박사과정 진학

백지훈-(주)태경농산 연구원 취업

이은정-한국식품연구원 취업

조인희-(주)와이디생명과학 연구원 취업

한선영-한림대학교 식품영양학과 박사과정 진학

#### 4) 언론홍보

- 2015년 농림수산물기술기획평가원에서 주최한 킨텍스에서 열린 『기술수요자와 공급자간 만남의 장』이라는 타이틀로 농식품 기술이전 설명회에서 본 연구팀이 ‘차즈기차 제조 및 이를 활용한 음료조성물 제조방법’ 기술의 내용을 홍보함.
- 많은 농가를 포함한 농업조합, 또한 음료 업체 등에서의 기술이전에 대한 관심을 받는 기회가 되었으며, 향후 차즈기 소재의 다양한 활용성을 기대해 볼 수 있음.

#### 5) 교육지도

- 한림대학교에서 다하누(주)로 분기별 1회 단위를 거쳐 각각의 내용을 기술지도함
  - 1) 차즈기 추출물 제조 및 분리 방법
  - 2) 차즈기 추출물의 항동맥경화성 기능 물질 효능
  - 3) 차즈기 추출물의 콜레스테롤 저하 효능
  - 4) 차즈기 추출물에서의 혈관 강화 개선용에 대한 유효 성분 지표 확인 및 분리 방법 확인
  - 5) 유효 성분의 대량화 공정 적용 가능성 제시
  - 6) 차즈기차 제조를 위한 효능 극대화 및 제조법 표준화

#### 6) 시제품

- 본 연구를 진행하면서 차즈기 소재의 항죽상동맥경화 및 콜레스테롤 저하 효능에 대한 연구 결과를 토대로 다하누와 한림대학교 명의로 차즈기차를 시제품으로 제작함. 차즈기차의 분획별 효능을 확인하여 최적의 조건을 확립하고, 해당 분획의 대량 생산을 통해 관능 평가 후, 티백으로 제조 및 티백들을 고급형 지관통에 넣어 포장함으로써 ‘차즈기’소재의 고부가가치소재로서의 활용성 다양화를 추구함.

## 2. 연구성과 추후계획

### 1) 논문

- ‘Antioxidant activity and optimization of condition for extraction of a HPLC method for the analysis of  $\alpha$ -asarone from *Perilla frutescens*’ 논문을 최종 교정 중에 있으며 교정 완료 후 International Journal of Food Science and Technology 저널에 게재 예정
- ‘Dietary compound  $\alpha$ -asarone alleviates ER stress-mediated apoptosis in  $7\beta$ -hydroxycholesterol-challenged macrophages’ 투고 (Molecular Nutrition & Food Research)되어 revision 중에 있음.
- ‘Cholesterol-lowering effect of polyphenols from *Perilla Frutescens* in hypercholesterolemia rat induced by high cholesterol diet’ 투고 (Food Research International)되어 심사 중에 있음.
- ‘Ultrafiltration liquid chromatography for screening and isolating potential xanthine oxidase inhibitors from *Perilla frutescens*’ 논문을 작성 중에 있으며 마무리 단계에 있어

2015년 12월내에 투고 할 계획임.

- 'Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of *Perilla frutescens*' 논문을 data 확보 중에 있으며 데이터 확보 후 논문을 완성하여 2015년 12월내에 투고 할 계획임.
- 'α-Asarone prevents advanced atherosclerosis by promoting autophagy in oxysterol-laden macrophages'의 data 확보를 마무리하여 2015년 12월내에 투고 할 계획임.

## 2) 특허

- '항산화 활성이 우수한 차즈기 및 수국 잎의 비율별 제조방법과 이를 유효성분으로 하는 차즈기-수국 티백 및 기능성 음료 제조방법'에 대한 특허를 진행 중에 있으며 수일 내에 특허 출원을 할 계획임.
- 현재 진행중인 차즈기 추출물의 MC fraction에 대한 효능의 data를 수집하여 '차즈기 추출물의 MC 세부 fraction의 혈관 강화용 기능성 조성물'에 대한 내용으로 2015년 12월에 출원할 계획임.
- '혈중 콜레스테롤 감소활성이 우수한 차즈기유래 천연물'출원 준비 중

## 3) 기술이전

'차즈기차, 이의 제조방법, 차즈기차 추출물을 포함하는 음료 조성물 및 이의 제조방법'에 대한 전용실시권 기술이전 계획  
 '항산화 활성이 우수한 차즈기 및 수국 잎의 비율별 제조방법과 이를 유효성분으로 하는 차즈기-수국 티백 및 기능성 음료 제조방법'에 대한 전용실시권 기술이전 계획

## 3. 연구성과 활용 계획

- 1) 본 과제에서 획득한 콜레스테롤 대사 조절과 경화성 혈관질환의 퇴치에 효능을 가진 차즈기 소재 추출물 및 유효 성분을 이용하여 농가 소득 상승 가치의 소재로써 고소득 작물로서의 활용을 적극 추진
- 2) 차즈기 소재의 경화성 혈관질환 예방과 치료에 대한 검증된 효능을 홍보하여 새로운 건강기능식품의 원료로 상품화를 위한 기술이전 노력
- 3) 효능 극대화의 기술적인 배경과 과학적인 효능을 규명하여 발표한 특허 및 논문 등의 확보된 지식재산권을 이용하여 건강기능식품의 상품화 추진
- 4) 사용된 연구개발 기술을 기반으로 다른 천연물로부터의 동맥경화성 억제효능을 갖는 기능적 소재를 지속적으로 개발하는데 적극적으로 활용

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	1	1		3	1	시제품

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

죽상동맥경화증에서 대식세포의 역할 및 치료 타겟 기전에 대한 기술정보 입수 (Moore KJ and Tabas I., *The cellular biology of macrophages in atherosclerosis*. 2011, *Cell*, 145(3):341-355)

대식세포는 노화에 따른 만성질환 (암, 대사성질환, 죽상동맥경화증 등)에서 주요 역할을 한다. 죽상동맥경화증은 복합 염증성 반응 질환으로 monocytes가 apoB-지단백질 등에 의해 대식세포로 활성화되고, 염증에 반응할 수 있는 대식세포는 동맥의 내막에 침윤되어 다양한 지질을 축적하면서 점차 죽종을 형성한다. 특히, 본 연구에서 참고한 부분은 대식세포의 콜레스테롤 침착 및 축적에 대한 세포 기전 및 역할과 후기 과정의 죽상동맥경화증에서 대식세포의 역할이다. 대식세포가 다양한 지질을 포함하는 components에 의해 세포 내 지질독성을 유발하고, 이로 인한 대식세포의 사멸은 죽상동맥경화증을 더욱 심화시키는 원인이 된다.

대식세포의 사멸을 유발하는 원인은 다양하나 최근에는 소포체 스트레스가 큰 주목을 받고 있다. 따라서 oxysterol을 포함하는 다양한 지질 독성 유발 물질의 영향으로 인한 소포체 스트레스를 통한 대식세포의 사멸을 억제하는 것이 죽상동맥경화증을 예방할 수 있는 새로운 타겟 기전이 될 수 있다. 종전의 기술인 단순 지질개선에 의한 차즈기의 죽상경화증에 대한 효능을 연구하기 보다는 대식세포의 소포체 스트레스에 의한 죽상경화 억제효능 연구는 차즈기 신기능성 물질에 대한 지적재산권을 확보하기에 수월하다는 차별성을 가질 수 있다.

*Perilla frutescens*의 식품 또는 약학적으로 생리활성 기능을 가지는 단일 유효 성분 연구를 위한 정보 입수(Igarashi M and Miyazaki Y., *A review on bioactivities of Perilla: progress in research on the functions of Perilla as medicine and food*. 2013, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:925342)

*Perilla*, 즉 차즈기, 는 향을 가지는 대표적인 식물로 아시아인이 주로 즐겨 먹거나 약용으로 사용되는 허브이다. 차즈기는 전통적인 약용 효능으로 우울증, 천식 등에 효능이 있다고 알려져 있다. 차즈기 추출물은 혈관 평활근세포에서 NO의 생성을 조절하면서 죽상동맥경화증에 효능이 있다고 알려져 있다. 또한, 간세포인 HepG2 세포에서 세포 사멸을 억제함으로써 간기능 강화에도 효과가 있다고 알려져 있다. *Perilla*에는 대표적으로 essential oil과 perillaldehyde, perillyl alcohol, limonene, alpha-pinene, trans-shisool 등이 있으며, 보라색의 색소인 shisonin과 cyanin도 다량 함유되어 있으며, rosmarinic acid, adenine, arginine 등이 풍부하게 존재하는 허브이다.

따라서 본 연구팀에서 진행했던 *Perilla*에서 분리한  $\alpha$ -asarone은 선행 효능 연구 및 분리에 대한 연구가 미비하므로 지속적인 연구 결과를 통해 보다 효과적인 차즈기 소재의 건강기능식품 및 신약 소재 활용성을 기대해 볼 수 있다. 최근 본 연구팀에서는 asaronic acid를 새로이 발굴하게 되면서 이에 대한 신기능성을 확보하고자 추후 연구방향을 모색하고 있다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

연구시설 및 장비명	용도	보유기관
CO <sub>2</sub> incubator	세포배양	한림대학교
clean bench	세포 배양 및 subculture	한림대학교
autoclave	멸균 처리기	한림대학교
광학 현미경 시스템	세포 및 조직 구조 확인	한림대학교
protein electrophoresis	protein 전기영동	한림대학교
UV spectrophotometer	sample spectrum 측정	한림대학교
fluorometer	형광 sample 흡광도 측정	한림대학교
자동조직처리기	동물 조직 포매를 위한 자동화 처리	한림대학교
파라핀 포매기	동물 조직 구조 파악을 위한 파라핀 포매	한림대학교
동결조직절편기	동물 조직 구조 파악을 위한 조직 미세 절편	한림대학교
ultrapure water system	3차 증류수 제조	한림대학교
Agilent HPLC 1100 series	성분분석	한림대학교
Agilent HPLC 1200 series	성분분석	한림대학교
LC908-C60 Recycling HPLC	성분정제	한림대학교
동결건조기	시료분말화	한림대학교
진공저온추출기	시료추출	한림대학교
대용량 농축기	시료(대량)농축	한림대학교
질소농축기	시료(소량)농축	한림대학교
TLC 검출 시스템	성분 확인 검출 시스템	한림대학교
항온항습기	항온항습유지시스템	한림대학교
UHPLC	초고속성분분석	한림대학교
GC-MS	Gas이용 성분분석기	한림대학교

## 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

- ▶ 본 과제는 한림대학교 실험실 안전관리위원회 규정을 준수하여 시행하였고, 연구원들은 연구실 안전관리법에 의거하여 1년에 12시간 의무로 규정되어 있는 연구종사자 안전교육을 실시하였다. 또한, 교육을 수료한 연구원들에 한하여 수료증이 발급되고 수료증을 발급받은 연구원에게만 실험실 출입을 가능하게 함으로써 연구실 안전관리법 준수를 의무화하였다.
- ▶ 유전자변형체를 이용한 세포 배양 등의 연구과제 수행 시 LMO 신고 및 허가 후에 안전한 연구시설을 이용할 수 있게 하고 실험을 진행할 수 있게 하였다.
- ▶ 다양한 인화성·발암성 물질을 사용하기 때문에 후드시설 등을 갖춘 안전한 실험환경을 조성한 후 연구를 수행하였고, 이러한 물질의 안전한 보관을 위해 연구실 안전관리법에 의거한 전용 보관장에 보관하였다.
- ▶ 제1협동 연구팀에서는 연구 개발을 위해 다양한 종류의 유기 용매를 사용하고 있고, 특히 가온 등의 공정에서 발생하는 위험 요인을 보유하고 있어서 사전에 이러한 위험요인을 파악하고 월 1회 전체 연구원들의 안전교육을 실시하였다.
- ▶ 실험실에 소화기 등을 비치하여 관리하고 있고, 연구원들에게 소화기 위치와 사용법을 주기적으로 안내하였다.
- ▶ 모든 연구원들은 학교 또는 기업에서 비상시 대비 보험에 가입되어 연구종사자의 권리를 존중받고 있다.

## 제 9 장   참고문헌

- 통계청 보도자료 2014.09.23. “2013년 사망원인통계”
- 보건복지부 2015.01.20. “2013 국민건강통계 - 국민건강영양조사 제6기 1차년도(2013)”
- WHO 2014.05. “The top 10 causes of death”
- 보건산업통계 2015.04.21. “2014년 식품산업 분석 보고서”
- 농업기술실용화재단 2013.12. “건강기능식품 산업동향 보고서”
- 식품의약품안전처 2014.02.28. “건강기능식품 기능성 원료 인정 현황”
- 한국보건산업진흥원 2012.08.20. “건강기능식품산업 글로벌 트렌드”
- 타임지 2015.02. “타임지 선정 세계 10대 푸드”
- 식품의약품안전처 식품원재료 검색 활용, [http://fse.foodnara.go.kr/origin/search\\_ok.jsp](http://fse.foodnara.go.kr/origin/search_ok.jsp)
- 식품의약품안전청 2009.02.24 “기능성 원료 인정 및 기술단계 분석”
- 기능식품신문 2005.07.04. [www.kfda.go.kr](http://www.kfda.go.kr)
- 식품의약품안전청 행정간행물번호 11-14700000-001655-01 건강기능식품 개발자를 위한 기능성 원료 표준화 지침서
- Lichenstein AH and Brecher P, Properties of acyl CoA: cholesterol acyltransferase in rat liver microsomes. J Biol Chem 255: 9098-9104, 1980
- Polokoff, M. A., Coleman, R. A., and Bell, R. M. Evidence that cholic acid CoA ligase is located asymmetrically on the cytoplasmic surface of hepatic microsomal vesicles. J Lipid Res 20. 17-21, 1979
- Moore KJ and Tabas I. The cellular biology of macrophages in atherosclerosis. Cell 145(3): 341-355, 2011
- Igarashi M and Miyazaki Y. A review on bioactivities of Perilla: progress in research on the functions of Perilla as medicine and food. Evid Based Complement Alternat Med 2013: 925342, 2013

[첨부]

## 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	콜레스테롤 대사와 경화성 혈관질환 퇴치를 위한 차즈기 이용 기술 개발		
주관연구책임자	강 영 희	주관기관	한림대학교

### 1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		비고
		우리나라	연구신청팀	
고콜레스테롤혈증 개선 치료제	미국	60%	80%	
죽상동맥경화증 치료제	미국	50%	80%	
차즈기 이용 제품개발	일본	50%	70%	

### 2. 특허분석

#### 가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB( <a href="http://www.kipris.or.kr">www.kipris.or.kr</a> ), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

#### 나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)
Keyword	hypercholesterolemia, atherosclerosis	perilla frutescens
검색건수	2,612	1,497
유효특허건수	783	74
핵심특허 및 관련성	특허명 울금 및 연잎 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증 또는 비만의 개선 및 치료용 조성물 (A composition comprising the combined extract of Curcuma Longa L. and Nelumbo nucifera as an active ingredient showing anti-obesity and anti-hypercholesterolemia activity)	자소엽 추출물을 포함하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 의약 조성물 (Medical composition comprising Perilla frutescens extract for preventing brain neuronal disease)

보유국	대한민국	대한민국
등록년도	2014	2014
관련성(%)	50%	25%
유사점	고콜레스테롤혈증을 개선할 수 있는 울금 및 연잎 조합 추출물	차즈기(자소엽) 추출물과 유효 성분을 통한 생리활성 효능 입증 평가
차이점	고콜레스테롤혈증과 연관된 다양한 질환 중 죽상동맥경화증이 아니라 비만을 개선할 수 있는 점	차즈기 추출물로 혈관강화용이 아닌 뇌신경질환 예방용의 조성물로서 연구를 하였고, 분리한 유효 성분이 벤조 나프토 티오펜으로 알파-아사론과 다름

### 3. 논문분석

#### 가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

#### 나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)
Keyword	hypercholesterolemia, atherosclerosis	perilla frutescens
검색건수	1,392	101
유효논문건수	46	21
핵심논문 및 관련성	논문명	Effects of dietary Corinthian currants ( <i>Vitis vinifera</i> L., var. Apyrena) on atherosclerosis and plasma phenolic compounds during prolonged hypercholesterolemia in New Zealand White rabbits
	학술지명	Food & Function
	저자	Yanni AE, Efthymiou V, Lelovas P, Agrogiannis G, Kostomitsopoulos N, Karathanos VT
	게재년도	2015
	관련성(%)	25%
	유사점	천연물 유래 추출물을 사용한 고콜레스테롤혈증으로 인한 죽상동맥경화증의 완화 효과를 확인
	차이점	차즈기 추출물이 아닌 Corinthian currant ( <i>Vitis vinifera</i> L., var. Apyrena)의 추출물을 사용하였고,

		New Zealand White 토끼를 사용하여 효능을 확인함	
--	--	---------------------------------------	--

#### 4. 제품 및 시장 분석

##### 가. 생산 및 시장현황

###### 1) 국내 건강기능 제품생산 및 시장 현황

- 우리나라의 건강기능식품산업은 선진기술을 바탕으로 국내 자생원료만으로 개발이 가능하다. 또한 국내식품산업 구조개선 전략분야로 인식되어 관련제도 및 국가적 지원규모가 크게 확대 및 건강기능식품으로 촉발된 식품과 의약품의 산업간·학문간·시장간의 부분적 통합 움직임이 활발히 이루어지고 있어 잠재적 시장성은 더욱 확대될 것으로 전망하고 있다.
- 2013년 국내 건강기능식품 시장 규모는 1조 7,920억원으로 전년대비 5.2% 성장하여, 최근 5년간 연평균 성장률은 11.5%로 나타났으며, 2009년 이후 지속적인 성장세를 보이고 있다. 또한, 생산액은 1조 4,820억 원으로 전년대비 5.2% 증가하였고, 총 생산액 중 내수용은 전년대비 4.1% 증가에 그친 반면, 수출용은 29.1%로 매우 큰 성장세를 보였다. 그 중 '개별인정형'제품이 전년대비 29% 증가하였고, 프로바이오틱스 제품이 전년대비 55% 증가하여 증가와 성장이 동시에 된 품목으로 인정되었다.
- 또한, 소비자가 고려하는 건강기능식품의 목적으로는 1위가 피로회복으로 31.8%이며, 면역력 증진(26.6%), 전반적 건강증진(14.7%), 영양보충(13.5%), 혈행개선(4.5%) 등의 순으로 관심도가 조사되었다.
- 업소별 생산실적 순위로는 2013년 (주)한국인삼공사(4,288억 원, 28.8%)가 홍삼제품의 지속적인 인기로 2004년부터 현재까지 1위로 나타났으며, (주)한국야쿠르트(786억 원, 5.3%), (주)서홍캡셀(549억 원, 3.9%), (주)노바렉스(509억 원, 3.4%), 코스맥스바이오(주)(507억 원, 3.4%) 등의 순으로 분석되었고, 생산실적 상위 10대 업체가 차지하는 비중은 전체 건강기능식품 출하액의 59.2%로 많은 비중을 차지하고 있다.

\*출처 : 2014년 식품산업 분석 보고서 (보건산업진흥원)

###### 2) 국외 건강기능 제품생산 및 시장 현황

- 2012년 세계 건강기능식품 (Global Nutrition Industry) 시장규모는 약 3,464억달러 (전년 대비 7.1% 성장)이며, 품목으로는 supplements, natural/organic food, N & OPC & Household Product, functional food로 구분되며, 국내에 상응하는 품목으로는 supplements이다.
- 세계 건강기능식품 중 supplements의 시장규모는 961억 달러이다.
- 또한, 국가별 시장규모에서는 2012년 미국이 325억 달러로 전체 시장의 33.8%를 차지하면서 1위를 차지하였고, 유럽 159억 달러(16.5%), 중국 119억 달러(12.4%), 일본 106억 달러(11.0%) 순으로 조사되었다.
- 특히, 남미의 경우에는 세계 6위로 전년대비 성장률이 12.9%를 차지하면서 매우 높은 성장세를 보인 반면, 일본의 경우 0.4% 성장률로 매우 저조한 성장세를 보임으로써 향후 시장점유율에서 순위변동이 있을 것이라고 예측된다.

\*출처 : 2014년 식품산업 분석 보고서 (보건산업진흥원)

## 나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

### 1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

#### (1) 차즈기 추출물로 죽상동맥경화증의 개선 건강기능성 제품 개발

선행연구를 통하여 죽상동맥경화증에 효능을 보였으며, 차즈기 추출물로부터 유효성분을 분리하여 죽상동맥경화증 효능을 보이는 기능성 유효성분을 확인하고, 이것을 바탕으로 기능성성분이 강화된 다양한 형태의 시제품의 개발이 가능할 것이다.

#### (2) 차즈기 추출물과 유효성분을 이용한 신약 소재 활용 제시

차즈기로 새로운 신약소재 원료 활용성을 제시 할 수 있다.

#### (3) 사회적으로 대두되고 있는 혈관성질환 치료에 대한 경쟁력 있는 새로운 제품 수요 창출

차즈기의 신기능성을 제시하였고, 기능성이 강화된 고부가치 제품의 개발은 새로운 수요창출과 시장형성이 기대되는 경쟁력 있는 사업으로 육성하여 국가 경제·산업적 측면에서 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있다.

#### (4) 농촌경제 발전 도모

차즈기를 이용하여 고부가가치성 물질로 소재화함으로써 시장 경쟁성을 높일 수 있고, 이는 타 농산물에도 적용 가능한 모델이기 때문에 농촌 경제의 발전을 도모할 수 있다.

차즈기 신기능이 알려지면서 재배 농가 소득이 보장될 때 농업 인구의 이동이 감소되어 농촌의 공동화를 가능하게 하고, 인구의 도시집중화로부터 기인하는 사회적인 문제를 완화시킬 수 있다.

### 2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	계
직접 경제효과	-	100	300	400
경제적 파급효과	50	200	500	750
부가가치 창출액	50	300	700	1,050
합 계	100	600	1,500	2,200

## 5. 3P(특허,논문,제품) 분석을 통한 연구추진계획

### 가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

#### 1) 특허분석 측면

기존 특허는 항산화·항피부염 등의 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 콜레스테롤의 유출 및 조절을 통한 항죽상동맥경화성 방향으로 연구를 추진하여 차즈기의 새로운 신기능을 입증하고 이것으로 고콜레스테롤혈증을 조절하며 이로 인한 죽상동맥경화증의 보호 및 개선의 효능 입증을 확인하여 추출물 이외에 유효성분에 대해서도 특허권을 확보할 예정이다.

#### 2) 논문분석 측면

기존 논문은 차즈기 추출물의 항염증·항산화·항피부염·항알레르기성 반응에 대한 효능 입증만 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 콜레스테롤의 유출 및 조절 기전 연구 방향을 핫이슈되고 있는 ER stress와 autophagy에 초점을 맞추어 연구활동을 추진하여 차즈기의 새로운 효능 입증으로 항동맥경화성 효능을 연구하고자 한다.

#### 3) 제품 및 시장분석 측면

본 연구과제에서는 혈관성질환을 개선하는 식음료를 비롯한 건강기능성 식품 개발을 목적으로 하며, 차즈기의 죽상동맥경화증의 개선용 조성물을 연구하여 시제품 제작 및 제품화를 통한 시장경쟁력을 고취하고자 한다.

활용 가능한 제품군: 협력기업(다하누)의 제품에 접목시켜 차즈기의 추출물과 유효성분이 콜레스테롤 흡수 저하 및 조절을 통한 죽상동맥경화증 예방을 목적으로 한 기능성 식품을 제조하고자 하였다. 이에 따른 시제품으로 차즈기차를 제작하였고, 차즈기 추출 성분을 티백에 넣어 제조함으로써 통상적으로 부담없이 접할 수 있도록 제조하고, 제품화를 진행함으로써 식음료 시장에서의 진출을 목표로 하고 있다.

## 주 의

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