

최 종
연구보고서

664
L293K.

농수산자원을 활용하여 순환기 질환 및 치매의 예방을 위한 기능성 식품개발

Development of Functional Foods for the Prevention
of the Circulatory Diseases and Dementia Using
Agricultural and Fishery Resources

연구기관

한림대학교
(한양대학교)

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농수산자원을 활용하여 순환기질환 및 치매의 예방을 위한
기능성식품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 29 .

주관연구기관명 : 한림대학교

총괄연구책임자 : 신 현 경

세부연구책임자 : 오 양 석

세부연구책임자 : 김 영 희

연 구 원 : 이정선 최평원 김수진

염태라 박옥희 원무호

서준교 박윤주 신재원

도선길 송동근 서홍원

손종근 이경선 정전섭

원제성 임영빈

협동연구기관명 : 한양대학교

협동연구책임자 : 양 차 범

연 구 원 : 권영숙, 이정란

요 약 문

I. 제목

순환기질환 및 치매의 예방을 위한 기능성식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

수명이 연장되고 생활양식이 변함에 따라 고혈압 및 치매와 같은 순환기질환의 발병율이 지속적으로 증가하여 이의 예방 및 치료에 대한 수요가 크게 증가하고 있다. 특히 이들 질병은 노화가 진행됨에 따라 모든 사람들에게 어느 정도씩 진행되므로 이의 예방 및 지연을 위한 다각적 노력이 필요하며 이러한 노력의 일환으로 효능 있는 기능성식품의 개발이 절실하게 필요한 실정이다. 특히 농산물개방 이후 우리나라의 농업여건에 적합한 고소득작물로서는 생리적 활성을 함유하고 있는 농산물의 생산이 가장 적합한 분야로 판단되고 있다. 따라서 본 연구에서는 우리가 일상적으로 생산되는 각종 과채류, 두류, 곡류, 어패류 및 생약자원 등 국산 농수산물자원으로부터 사회적 수요가 크게 나타나고 있는 고혈압 및 치매의 예방 및 치료보조효과를 갖는 기능성 소재를 탐색한 다음 이의 효능을 동물실험을 통하여 평가하고 이를 바탕으로 최종 선별된 소재를 활용하여 식품으로써 다량 소비될 수 있는 기능성 식품을 개발, 공급함으로써 원료 농수산물을 생산하는 농민들의 소득을 제고하고 아울러 시장개방체제에서 우리나라의 농민들에게 적합한 경쟁력 있는 고소득 대체작물을 제시하는 것이 본 연구개발의 최종목표이다.

III. 연구개발내용 및 범위

1. 1차년도(1995)

○ *in vitro* 검색방법 (Angiotensin converting enzyme법, ACE법)을 이용한 생약소재

로부터 고혈압 억제 소재의 1차탐색

- ACE법을 이용하여 채소류, 다류 및 수산물로부터 고혈압 억제 소재의 탐색
- 자연발증 고혈압 모델동물의 확보 및 육성
- 허혈성 심장병 모델동물의 창출 및 육성
- 생약재 추출액 수준에서 치매유발 베타아밀로이드 독성 저해효과 및 항산화 활성 검색

2. 2차년도(1996)

- 추출액 수준에서 혈압상승억제 소재의 2차탐색
- 고혈압 모델동물에서 유효성 평가
- 치매예방소재의 2차탐색

3. 3차년도(1997)

- 고혈압쥐를 이용한 혈압조절 효능 조사
- 모델동물을 이용한 치매억제 효능 조사
- 고혈압 유효성분의 분리 및 구조분석
- 치매 유효성분의 분리 및 구조분석
- 기능성식품 시제품 제조 및 제조방법 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 고혈압예방소재의 탐색

1) 생약소재로 부터 고혈압 예방소재의 탐색

생약소재로서 건강식품 또는 기능성식품소재로서 활용가능하다고 판단되는 80 여

종의 시료를 구입하여 70% ethanol로 추출한 다음 동결건조한 시료를 사용하여 혈압 상승효소인 Angiotensin converting enzyme(ACE)의 활성을 저해하는 정도를 조사한 결과 파극, 단삼, 복분자, 속단, 우슬, 측박, 현초, 건칠, 감초 및 송절 등이 1차 선정되었고 이어서 건조추출물의 수율과 식품소재로서의 맛 등을 고려하여 감초, 두충, 상백피 및 우슬을 2차 동물실험을 위한 시료로 선정하였다.

2) 식품소재로 부터 고혈압예방소재의 탐색

국산 곡류, 서류, 과실류, 채소류, 어패류 등 110종의 식품소재를 선정하여 물 및 유기용매로 추출하여 ACE저해활성을 조사한 결과 브로콜리, 돌미나리, 돌나물, 부추, 마늘, 파슬리, 소라, 메밀, 귀리, 팥, 동부 및 강낭콩에서 비교적 높은 ACE저해 활성을 나타냈으며, 이들 중 브로콜리, 돌미나리 및 마늘을 2차 동물실험을 위한 시료로 선정하였다. 그리고 *in vitro* 실험으로 각 추출물 중 ACE저해활성을 나타내는 성분을 분석한 결과 돌미나리의 경우 Adenosine이 유효성분으로 밝혀졌으며, 소라, 강낭콩, 팥의 경우 유효성분이 peptide로 나타났으며 브로콜리의 경우 획분 수준까지 분석이 이루어졌다.

나. 순환기질환 예방소재의 *in vivo* 평가

1) 고혈압 및 뇌졸중 모델의 육성

자연발증 고혈압모델동물(Spontaneously hypertensive rats, SHR)을 육성하여 혈압을 측정하고 결과 생후 10주부터 고혈압증세를 보이기 시작하여 생후 40주에는 완전한 고혈압상태가 됨으로써 모델로써 유용한 것으로 판단되었다. 또한 허혈성 뇌졸중 모델로서 Mongolian gerbil의 양측 경동맥을 5분간 결찰한 후 재관류하여 4-7일 뒤 학습 및 기억을 관장하는 뇌해마 부위의 신경세포 손상이 뚜렷이 관찰되고 이 손상이 Eugenol의 투여에 의해 용량 의존적으로 억제됨으로써 이 모델이 뇌졸중 억제소재의 탐색에 이용될 수 있음을 밝혔다.

2) 고혈압 예방소재의 *in vivo* 평가

in vitro ACE 저해능을 기준으로 선정된 감초, 두충, 상백피, 우슬 등 생약소재와 브로콜리, 돌미나리, 마늘 및 표고버섯을 추출물 형태로 음용수에 타서 섭취시키거나, 분말형태로 식이에 혼합하여 SHR에 4주 동안 섭취시키면서 혈압을 조사하고 심박동수, 지질 및 심장과 신장의 조직에 미치는 영향을 조사하였다. 생후 10개월의 SHR에서 우슬, 감초, 브로콜리의 추출물(100mg/체중100g)을 음용수에 타서 30일간 섭취시킨 결과 확장기혈압 및 수축기혈압이 낮아지는 경향을 보였으나, 통계적으로 대조군과 비교하여 유의차가 없었다. 생후 8개월의 SHR에게 이들 추출물을 45일간 투여한 결과 확장기 및 수축기혈압의 증가폭이 우슬 및 감초 투여군에서 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 마늘, 표고버섯, 두충, 상백피 및 돌미나리의 건조분말을 10개월된 고혈압쥐의 식이에 각각 3%, 5%, 2%, 2% 및 3%량씩 첨가하여 4주간 사양실험을 실시하면서 혈압 변화를 조사한 결과 실험식이 공급 3주후 부터 대조군에 비하여 수축기 혈압이 유의하게 낮아져 마늘 19.0mmHg, 표고버섯 30.0mmHg, 두충 30.9mmHg, 상백피 21.9mmHg 씩 낮추는 효과를 나타냈다. 한편 확장기 혈압은 표고버섯군에서 28.2mmHg, 두충군에서 22.9mmHg 씩 유의하게 낮추었고 마늘군에서는 유의한 차가 없어 8주령의 SHR을 사용하여 마늘 3%식이를 투여한 결과 유의적인 차이를 나타내 4주후에 24.8mmHg을 감소시켰다. 한편 마늘 1% 투여군과 돌미나리 3% 투여군에서는 수축기 및 확장기 혈압의 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 또한 심장 및 신장조직에 미치는 영향을 조사한 결과 대조군에 비해 마늘, 표고버섯 및 두충 투여군에서 심장의 좌심실 비대가 완화되었고 신장에서 간질세포의 비후가 완화됨으로써 혈압강하에 의한 효과로 추정되었다.

다. 치매의 예방을 위한 소재의 탐색 및 평가

가) 베타아밀로이드의 뇌실내 주사에 의한 *in vivo* 알츠하이머병 모델의 확립

베타아밀로이드($A\beta_{1-42}$) 1.85 μg 을 생쥐의 뇌실내로 주사한 경우, 투여 2일 및 8일 후 수동적 회피검사에서 step-through latency 가 유의하게 감소하여 유용한 치매모델로 이용될 수 있음을 확인하였다.

나) 베타 아밀로이드의 뇌실내 주사에 의한 in vivo 알츠하이머병 모델에서 당귀추출물의 효과

당귀추출액을 0.5-1g/kg의 용량으로 투여시 베타아밀로이드 주입에 의한 독성효과가 유의적으로 차단됨을 밝힌 다음 최소 유효투여량을 조사하기 위하여 당귀 추출액을 경구로 1일 1회 0.1 g/kg의 용량으로 1주, 2주, 4주동안 투여한 다음, 베타아밀로이드($A\beta_{1-42}$) 1.85 μg 을 생쥐의 뇌실내로 주사하여 보호효과를 조사한 결과 당귀추출액을 투여한 생쥐에서는 투여된 기간에 의존적으로 step-through latency 감소가 유의하게 억제되어 당귀의 기억력 감소 예방 효과를 확인하였다.

다) 당귀의 항염 및 항산화물질의 분리 및 성분분석

알츠하이머병의 베타아밀로이드($A\beta_{1-42}$) 독성은 항염제 및 항산화제로 경감될 수 있으므로 당귀에서 항염 및 항산화활성을 가지는 분획을 조사하였다. 그 결과 당귀의 부탄올분획 및 헥산분획에서 각각 항염 및 항산화활성을 보임을 확인하였고 현재 4-hydroxy- β -methoxybenzene ethanol과 nodakenin 2종의 물질에 대해 구조가 결정되었다.

라. 고혈압 및 치매예방소재의 제품화기술 개발

고혈압 억제소재로 마늘, 표고버섯 및 두충이 유효한 것으로 나타났고 치매억제소재로서 당귀가 효능이 있는 것으로 밝혀져 이들 중 다량 섭취가 용이하지 않은 마늘과 당귀에 대해서 다량 섭취할 수 있는 제품개발 방안이 제시되었다.

1) 마늘 가공품의 개발

마늘이 혈압강화 효과를 나타내기 위해서는 식이량의 3%량이 섭취되어야 하므로 이를 위해서는 마늘 고유의 매운맛이 상당히 제거되어야 한다. 마늘을 수증기로 10분 정도 가열처리하거나 전자렌지로 1분 내외 처리하여 매운맛의 생성효소를 불활성화시킨 다음 마쇄, 건조하여 분말제품을 제조한 다음 이를 다양한 형태로 섭취하거나 또는 마늘의 매운맛이 식초절임 및 간장 절임시 감소하므로 약 2개월 이상 절임 후 부식으로 섭취하는 방법이 적당할 것으로 조사되었다.

2) 당귀가공품의 개발

당귀가 치매예방 효능을 갖기 위해서는 성인의 경우 하루 6g의 추출물 섭취가 요구되므로 기존의 당귀차 형태로는 냄새와 고유의 맛이 너무 강하여 이를 완화하는 방법이 필요하다. 80-100℃의 물로 1시간 동안 추출하여 건물기준으로 40%이상의 높은 수율로 추출물을 제조할 수 있었고, 이 추출물을 활용하여 기호성이 좋은 젤리, 양갱 및 과일혼합음료를 제조할 수 있었다.

2. 활용에 대한 건의

가. 우리나라에서 생산되는 농수산물 및 생약소재로 부터 고혈압 억제가능소재로서 마늘, 표고버섯, 두충 등이 제시되었으며 치매억제 소재로서 당귀의 효능이 밝혀져 이들 소재를 활용한 다양한 기능성식품의 제조가능성과 소비확대를 위한 기초자료를 제시하였다.

나. 상기소재 중 마늘은 열처리하여 매운맛을 감소시킨 후 조미료용 분말제품이나 잼, 빵 등의 제조소재로 다량 섭취할 수 있는 제품개발이 가능하며, 식초절임 및 간장절임 형태로 다량 소비될 수 있다.

다. 당귀의 경우 에탄올 추출물 또는 물 추출물을 이용해 노인들이 섭취하기 용이한 젤리, 양갱 또는 혼합과일 주스형태의 제품개발이 가능하다.

라. 연구결과는 가능한한 특허를 신청하여 기술권을 확보하고 이를 활용하려는 농산물가공업체 또는 식품업체에 이전하여 실용화할 계획이다.

마. 개발기술의 실용화가 늦어질 경우 한림대학교의 창업 보육센터에서 기업을 창업하여 실용화를 추진할 계획이다.

SUMMARY

This research work was carried out to find some natural food materials or medicinal herbs which are effective in the prevention of hypertension or senile dementia. Screenings of functional materials with *in vitro* method were followed by evaluation works with *in vivo* animal models for their physiological effects. The selected materials were analyzed and processed to prepare functional food products effective against hypertension and dementia.

Part 1. Screening of anti-hypertensive materials

About 80 kinds of medicinal herbs and 110 kinds of food materials such as cereals, legumes, fruits, vegetables and shell fishes were extracted with water or 70% ethanol followed by freeze dehydration to be screened with their Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities. Among the medicinal plants, *Glycyrrhiza uralensis*, *Eucommia ulmoides*, *Morus alba* and *Achyranthes japonica* were selected in terms of ACE inhibitory activities, extract yields and organoleptic characteristics. Garlic, broccoli, small watercress and Shiitake mushroom from food materials were also chosen for the animal experiments. The active ACE inhibitory component of small watercress extract was identified as adenosine using several column chromatographies, HPLC, UV adsorption scanning and NMR spectrometries.

Part 2. *In vivo* evaluation of anti-hypertension activities for selected materials

Four medicinal herbs such as *Glycyrrhiza uralensis*, *Eucommia ulmoides*, *Morus alba* and *Achyranthes japonica*, and some food materials like garlic, brocolli, small watercress and Shiitake mushroom were fed to spontaneously hypertensive rats(SHR) for 4 weeks and evaluated in terms of their effects on the blood pressure and lipid profiles. In old SHR, the extracts of *Glacyrrihiza uralensis*, *Achyranthes japonica*, and brocolli had no significant effects on the regulation of blood pressure. When SHR were fed diets supplemented with garlic(3%), Shiitake mushroom(5%), *Eucommia ulmoides*(2%), and *Morus alba*(2%), their systolic blood pressures were significantly decreased by 19.0 mmHg, 30.0 mmHg, 30.9 mmHg and 21.9 mmHg respectively compared to that of control group after 3 weeks of feeding. In diastolic blood pressure, however, Shiitake mushroom and *Eucommia ulmoides* groups were significantly lowered than the control group by 28.2mmHg respectively. The garlic group showed a significant decrease of diastolic blood pressure in young SHR. The addition of small watercress(3%) or garlic powder (1%) did not show any significant reduction of either systolic or diastolic blood pressure of SHR.

Part 3. Screening and evaluation of preventive materials against dementia

This research has established several *in vitro* and *in vivo* models for Alzheimer's disease and screened crude natural products based on the beta-amyloid peptide toxicity, the inflammation mechanism or the oxidative stress mechanism of Alzheimer's disease pathogenesis. With the above models for Alzheimer's disease, the extract of *Angelica autiloba* was found to be the

most promising material and effective at the dose of 0.1g/kg rat weight in form of oral intake.

Part 4. Product development for the selected materials

Among the garlic, Shiitake mushroom and *Eucommia ulmoides* selected as anti-hypertensive materials and *Angelica autiloba* effective against Alzheimer's disease, garlic and *Angelica autiloba* were finally chosen for the development of functional foods. To remove the pungent taste of garlic, it was heat-treated for 10 minutes in hot steam or 1 minute in microwave oven. The heat-treated garlic cloves were dried and powdered with ordinary methods for various uses. Garlic pickles prepared by soaking in vinegar or in soy sauce are another products which could be consumed as side dish in large amount. The extract of *Angelica autiloba* could be prepared with a high yield of more than 40% on the basis of solid content using water extraction at 80~100°C for 1 hour. It was found that the effective dose of 6g extract was too large to intake because of its strong odor and taste. Jelly, gel-type products and beverage mixed with fruit juice such as grape juice were prepared using *Angelica autiloba* extract and found to be acceptable products.

Content

Chapter 1. Screening of antihypertensive food materials	19
Chapter 2. <i>In vivo</i> evaluation of antihypertensive activities for selected materials	133
Chapter 3. Screening and evaluation of preventive materials against dementia	198
chapter 4. Screening of antihypertensive medicinal herbs and product development against hypertension and dementia	245

목 차

제 1장 식품소재로 부터 고혈압 예방소재의 탐색	19
제 1절. 서 론	19
제 2절. 실험재료 및 방법	20
1. 재 료	20
2. 시료의 조제	21
3. 실험 방법	21
1) 물 추출	21
2) 유기용매 추출	21
3) 극성에 따른 용매별 획분화	22
4) 분리단백질의 제조	22
5) 단백질 가수분해	23
6) Peptide-nitrogen함량 측정	25
7) 투 석	26
8) ACE 저해효과의 측정	26
9) n-Butanol획분물로부터 ACE 저해물질의 분리 및 정제	27
10) 단백질 가수분해물의 ACE 저해물질 분리 및 정제	32
제 3절. 결과 및 고찰	35
1. 채소류 및 차류의 ACE 저해효과	35
2. 곡류, 서류, 두류, 과실류 및 어패류의 ACE저해효과	40
3. 소라의 ACE 저해물질 분석	47
4. 돌미나리의 ACE 저해물질 분석	60
5. 팔의 ACE 저해물질 분석	79
6. 강낭콩의 ACE 저해물질 분석	95

7. 브로콜리의 ACE 저해물질 분석	114
제 4절 : 결 론	123
참고 문헌	127

제 2장 순환기질환 예방 소재의 in vivo 평가133

제 1절 서론	133
1. 연구의 배경	133
2. 연구개발의 필요성	133
1) 기술적 측면	133
2) 경제적 측면	134
3) 사회적 측면	134
3. 연구개발의 목표	134
제 2절 실험재료 및 방법	135
1. 실험동물	135
2. 생약재와 식품 소재로부터 혈압 강하 물질의 확보	135
3. 체중, 혈압 및 심박동수의 측정	136
4. 혈액중 지질 성분의 분석	136
1) 총 콜레스테롤 분석	136
2) High density lipoprotein(HDL) 콜레스테롤 분석	137
3) 중성지질의 분석	137
4) Low density lipoprotein(LDL) 콜레스테롤의 계산	137
5) 동맥경화지수, HTR 및 LTR의 계산	137
5. 조직학적 검사	138
1) 육안 해부학적 조사	138
2) 조직처리 및 절편 제작	138

3) 염색 및 관찰	138
6. 뇌졸중 모델 개발	138
1) 흥분성 아미노산 유발 급성 신경 독성 모델의 확립	139
2) 흥분성 아미노산 유발 만성 신경 독성 모델의 확립	139
3) Mongolian gerbil에서의 전신성 뇌허혈(global ischemia) 손상 모델의 확립	139
7. 통계처리	139
제 3절 결과 및 고찰	140
1. 자연발증 고혈압 모델동물(spontaneously hypertensive rats, SHR) 및 대조군(Wister Kyoto rats, WKY)의 체중 및 혈압의 변화	140
2. 뇌졸중 모델 개발	144
1) 허혈성 뇌졸중의 시험관 모델 개발	144
2) 뇌졸중 모델동물인 Mongolian Gerbil을 이용한 global ischemia 모델 확립	144
3) 식물정유성분이 뇌허혈에 미치는 영향	145
4) 감식초 및 솔잎 엑기스가 뇌허혈에 미치는 영향	145
3. 우슬, 감초, 브로클리가 노령화된 SHR(10개월)의 혈압에 미치는 영향	148
4. 우슬, 감초, 브로클리가 젊은 SHR(8주령)의 혈압에 미치는 영향	158
5. 마늘, 표고버섯, 두충, 상백피가 혈압에 미치는 영향	168
1) 혈압의 변화	168
2) 지질성분의 변화	169
3) 심혈관계 질환의 위험도 판정	169
4) 조직학적 검사	175
6. 마늘이 혈압에 미치는 영향	179
1) 체중의 변화	179
2) 혈압 및 심박동수의 변화	179

7. 돌미나리가 혈압에 미치는 영향	181
1) 체중 변화 및 사료 섭취량	181
2) 혈압 및 심박동수의 변화	181
3) 지질치의 변화	182
4) 동맥경화 지수, HTR 및 LTR	182
8. 미늘이 혈압에 미치는 영향(농도실험)	187
제 4절 결론	189
참고문헌	192

제 3장 치매의 예방을 위한 소재의 탐색 및 평가198

제 1절 서론	198
제 2절 실험재료 및 방법	199
1) 검색대상 시료의 표준분획 제조	199
2) 신경세포 일차배양(primary culture)	200
3) 신경세포의 손상측정	200
4) 생화학적 검색	201
5) 뇌실내 주사	201
6) 뇌실내 H ₂ O ₂ 및 xanthine oxidase 투여로 인한 사망에 있어서 천연물 투여의 차단작용	201
7) 수동회피 반응 검사.	201
8) LPS 투여로 인한 사망에 대한 차단작용	202
제 3절 결과 및 고찰	202
1) 알츠하이머 병의 <i>in vitro</i> 모델의 확립	202
2) 노인성 치매의 병인에 밀접하게 연관된 유해 활성산소 억제작용 검색의 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 검색법을 확립	204

3) 노인성 치매의 질환모델의 확립	208
4) 노인성 치매의 병인에 밀접하게 연관된 <i>in vivo</i> 검색법 확립	219
5) 노인성 치매의 병인에 유해 활성산소억제작용 검색	221
6) 당귀의 성분분석 연구	222
제 4절 결론	240
참고문헌	242

제 4장 고혈압 및 치매예방소재의 제품화기술 개발249

제 1절 서론	245
제 2절 실험재료 및 방법	248
1. 고혈압 예방 생약소재의 탐색	248
가. 생약소재로부터 ACE 저해 소재탐색	248
1) 추출물의 제조	248
2) 실험방법	248
2. 선별된 고혈압 예방 생약소재의 <i>in vitro</i> 유효농도 조사 및 기호도 조사 ..	249
3. 고혈압 억제소재의 안정성 조사	250
가. pH의 영향	250
나. 온도의 영향	250
4. 마늘 및 당귀의 유리당 및 아미노산분석	250
가. 유리당 분석	250
나. 아미노산 분석	250
5. 시제품 제조	253
가. 마늘 가공품의 제조	253
나. 당귀 가공품의 제조	253
제 3절 결과 및 고찰	254

1. 고혈압 예방생약소재의 탐색	254
가. 생약소재 추출물의 ACE저해능 조사	254
2. 고혈압 예방 생약소재의 in vitro유효농도 조사 및 기호도 조사	258
3. 고혈압억제소재의 안정성 조사	261
가. pH에 대한 안정성	261
나. 온도에 대한 안정성	261
4. 마늘 및 당귀의 유리당 및 유리아미노산분석	264
5. 고혈압 및 치매예방소재의 제품화 기술개발	266
가. 마늘 가공품 제조	266
나. 당귀 가공품 제조	270
제 4절 결론	275
참고문헌	277

제 1장 식품소재로부터 고혈압 예방소재의 탐색

제 1절. 서론

성인병 중에서 가장 높은 사망률을 보이는 심혈관계 질환의 하나인 고혈압은 거의 모든 성인에게 출현할 가능성이 있는 질환으로 크게 발생원인에 따라 본태성고혈압(일차성고혈압)과 이차성 고혈압으로 분류할 수 있다. 본태성고혈압은 특별한 원인이 없이 생기는 것으로 전체 고혈압환자의 약 80%가 여기에 속하는 것으로 이의 발생기작은 확실하게 밝혀져 있지는 않으나 다양한 유전적 요소와 환경인자 즉 술, 담배, 스트레스, 염분, 비만 및 나이가 그 원인이 된다.

반면에 이차성고혈압이 발생하는 기작으로는 renin-angiotensin계가 생체의 혈압 조절에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹⁻³⁾

Angiotensin I converting enzyme (ACE, dipeptidyl carboxylpeptidase, EC 3,4,15,1)은 불활성 decapeptide 인 Angiotensin I의 C 말단 dipeptide (His-Leu)를 절단하여 혈관벽 평활근 수축 등의 작용에 의하여 강한 혈압상승작용을 나타내는 octapeptide인 Angiotensin II를 생성하는 한편, 강한 혈관확장작용을 가지는 nonapeptide인 bradykinin을 불활성화시키므로써 혈압을 상승시키는 역할을 한다고 알려져 있다⁴⁻⁶⁾.

ACE의 저해활성을 갖는 nonapeptide인 teprotide가 브라질산 뱀인 Bothrop jararaca의 독액으로부터 처음으로 분해되었으며, teprotide는 고 renin증 고혈압 환자에서 뿐 아니라 정상인에서도 현저한 혈압강하작용을 갖는다는 것이 밝혀짐으로써^{8,9)} ACE 저해능을 갖는 고혈압 치료제로서의 개발되고 합성하기에 이르렀다. 그후 식품으로부터 ACE 억제제들에 대한 치료제로서의 개발가능성이 제시되고 ACE저해효과가 있는 식품소재의 탐색연구가 이루어지게 되었다.

지금까지 ACE 저해활성이 있는 것으로 알려진 천연물 유래의 물질로는 casein¹²⁻¹⁸⁾, zein¹⁹⁻²¹⁾, 어패류²²⁻³³⁾ 및 두류의 가수분해물³⁴⁻³⁸⁾로부터 얻어진 peptide

류 또한 차의 polyphenol 성분³⁹⁾, 녹차의 flavon-3-ol 화합물⁴⁰⁾, 밀감껍질의 flavonoid glucoside^{41,42)}, 감잎의 flavonoid⁴³⁾ 등이 보고되어 있다. 일본의 경우 鈴木⁴⁴⁾에 의해 상용 식품 107종의 ACE 저해효과가 보고된 적이 있으나, 우리나라에서는 27종의 생약제와 몇종의 어류, 대두식품 등에 대해서 몇 편의 보고가 있으나 일반 식품재료에 대해 ACE 저해효과를 계통적으로 검색한 보고는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 한국산 채소류, 곡류, 서류, 두류, 견과류, 과실류, 어패류 및 전통차음료 등 총 110여종을 사용하여, 물 추출물에서 ACE 저해효과를 측정하고 물 추출물 중에서 ACE 저해효과가 높은 시료를 택하여 유기용매로 추출하여 각각의 가용성 획분과 불용성 획분의 ACE 저해효과로 추정 비교하고 또한 투석 및 가열에 따른 ACE 저해효과의 변화를 측정하였다. 그리고 국내산 식품재료 중 ACE 저해효과가 높은 재료, 즉 패류, 채소류, 두류 등 5종을 선정하여 물 또는 유기용매로 추출하여 농축시킨 다음 용매별 획분화를 통하여 유효성분을 추출하든지 혹은 효소 처리하여 얻은 단백질가수분해물을 얻어서 유효성분을 추출하여 이들을 Bio-gel p-2, Amberlite XAD-2, Silicagel G 60, Sephadex LH-20, SP Sephadex C-25-column chromatography등을 통하여 ACE 저해성분을 분리시키고, TLC 와 HPLC 등을 이용하여 얻은 ACE 저해 peptide 물질을 아미노산 분석과 protein sequencer를 이용하여 물질 동정을 하든지 또는 비peptide성 물질은 UV Spectrophotometer, Mass, NMR 등을 이용하여 ACE 저해물질의 구조분석을 행하였다.

제 2절. 실험재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 재료는 채소류 33종, 차류 6종, 곡류 14종, 서류 2종, 두류 7종, 견과류 3종, 과실류 24종, 어류 9종, 패류 10종 등을 서울 가락동 농수산물시장, 경동시장, 농협 공판장 등에서 구입하여 사용하였다.

2. 시료의 조제

채소류는 신선한 재료를 골라 50℃에서 24시간 정도 열풍건조시키고 분쇄기로 분쇄하여 분말시료를 얻어 사용하였고, 곡류, 서류는 40℃에서 24시간정도 열풍 건조시키고 miller로 분쇄하여 분말시료로 사용하였으며 과실류는 바로 동결 건조하여 분말로 하여 사용하였다. 두류, 견과류는 시장에서 구입한 것을 분쇄기로 분쇄하고 여기에 diethyl ether를 적당량 가해서 24~48시간 방치, 탈지시킨 후 흡인 여과하여 얻은 잔사를 39℃에서 열풍건조 시킨 다음 miller로 분쇄하여 탈지분말시료로 사용하였다.

생선과 패류는 껍질을 제거한 육질만을 취하여 여기에 5배량의 chloroform : MeOH (3 : 2, v/v) 혼합용매를 가하여 암소에서 24시간 방치, 탈지시킨 후 흡인 여과하여 얻은 잔사를 진공 동결 건조한 다음 분쇄기로 마쇄하여 탈지분말 시료를 얻었다.

3. 실험 방법

1) 물 추출

탈지 분말시료 20배의 증류수 가하고 잘 섞어서 50℃의 진탕수욕조에서 2~4시간 동안 추출한 후 2000×g에서 20분간 원심분리하여 그 상정액을 취한 후 이를 Whatman No. I 여과지로 여과하고 동결 건조한 후 물 추출물시료로 사용하였다.

2) 유기용매 추출

탈지분말시료에 각종 유기용매(methanol, ethanol, chloroform, ethyl ether, ethyl acetate)를 10배량씩 가하고 잘 섞은 후 상온에서 1시간동안 잘 교반하면서 추출한 후, 2000×g에서 20분간 원심분리하고 그 상정액과 잔사를 각각 취하여 상정액은 Whatman No. I 여과지로 여과한 후 petri dish에 넣어 40℃ 진공오븐에서 유기용매를 날려보낸 후 petri dish에 남아있고 추출물에 ether를 가하여 녹인 후 eppendorf tube에 옮겨 넣고 다시 실온에서 ether를 제거한 후 각종 용매의 가용

성 추출물 시료로 사용하였다. 잔사는 40℃에서 용매를 날려보낸 후 불용성 추출물 시료로 하였다.

3) 극성에 따른 용매별 획분화

채소류에서 시료의 추출은 조 등⁴⁰⁾의 방법을 변형하여 Fig. 1과 같이 건조시료에 60% acetone 수용액을 가하여 실온에서 30분간 초음파 처리(sonication) 시킨 후 이를 여과하여 추출액을 얻고 잔사에 다시 60% acetone 수용액을 가하여 동일한 추출 과정을 3회 반복하였다. 이상에서 얻은 추출액들을 모아 rotary evaporator로 감압 농축한 후 60% acetone 추출물 시료를 얻었다.

ACE 저해물질의 특성을 알아보기 위해 water, ethylacetate 및 n-butanol 등 극성이 다음 3가지의 용매를 이용하여 Fig. 1와 같은 방법^{41,60,61)}으로 용매별 획분화를 실시하였다.

시료의 60% acetone 추출물에 소량의 물을 가하여 분산시키고 이를 분액 깔때기에 넣어 ethylacetate를 가하여 흔들어 준 다음 일정시간 방치하여 분리가 이루어지면 상층액을 취하였다. 이 과정을 3회 반복하여 각 상층액을 모은 뒤 이를 여과하여 rotary evaporator로 감압 압축시켜 ethylacetate 추출물 시료로 사용하였다.

남아 있는 물 층에 n-butanol를 가하여 잘 흔들어준 후 이를 일정시간 방치시켜 분리가 이루어지면 상층액을 취하였다. 이 과정을 3회 반복한 후 각 상층액을 모아 이를 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축시켜 n-butanol 추출물 시료로 사용하였다. 남아 있는 물 층을 rotary evaporator로 감압 농축시켜 물 추출물 시료로 사용하였다.

4) 분리단백질의 제조

Ethyl ether로 탈지한 분말 두류 시료에 증류수를 가하여 잘 섞은 후 1N-NaOH 용액으로 pH 10.0으로 조절하고 30분간 교반하면서 단백질을 추출하였다. 이 추출용액을 1,000×g에서 20분간 원심분리하고 그 상정액을 취하여 1N-HCl 용액으로 pH 4.5

로 조정하면서 단백질을 침전시키고, 이를 1,000×g에서 20분간 원심분리하여 단백질 침전물을 얻고 이를 물로 씻은 후 동결건조하여 분리단백질 시료로 사용하였다.

5) 단백질 가수분해

단백질 가수분해는 Montecalvo등의 방법⁵¹⁾을 변형하여 7개의 효소를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, pepsin의 경우 분말단백질시료 3g을 증류수 289ml에서 분산시킨 후 2N-HCl 용액 11ml를 기하여 pH1.65로 조절하고 pepsin 효소액(pepsin 30mg을 증류수 1ml에 녹임)을 효소, 기질의 비가 1:100이 되도록 기질용액에 서서히 가해 37℃ 진탕항온수조에서 1, 4, 8 및 24시간 동안 가수분해하였다. 그 다음 100℃에서 10분간 가열하여 pepsin을 불활성시켜 반응을 정지시켰다.

이 가수분해물을 5,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 Whatman No. 1로 여과하여 얻은 여액을 동결건조하고 -5℃에서 저장하면서 시료로 사용하였다.

pepsin, α -chymotrypsin, trypsin 및 papain은 37℃에서, bromelain은 43℃, pancreatin은 40℃, alcalase는 60℃에서 그리고 pH는 pepsin이 1.85, pancreatin은 8.0으로 하고 그 외의 것은 pH 7.0으로 각각 조절한 후 가수분해를 실시하였다.

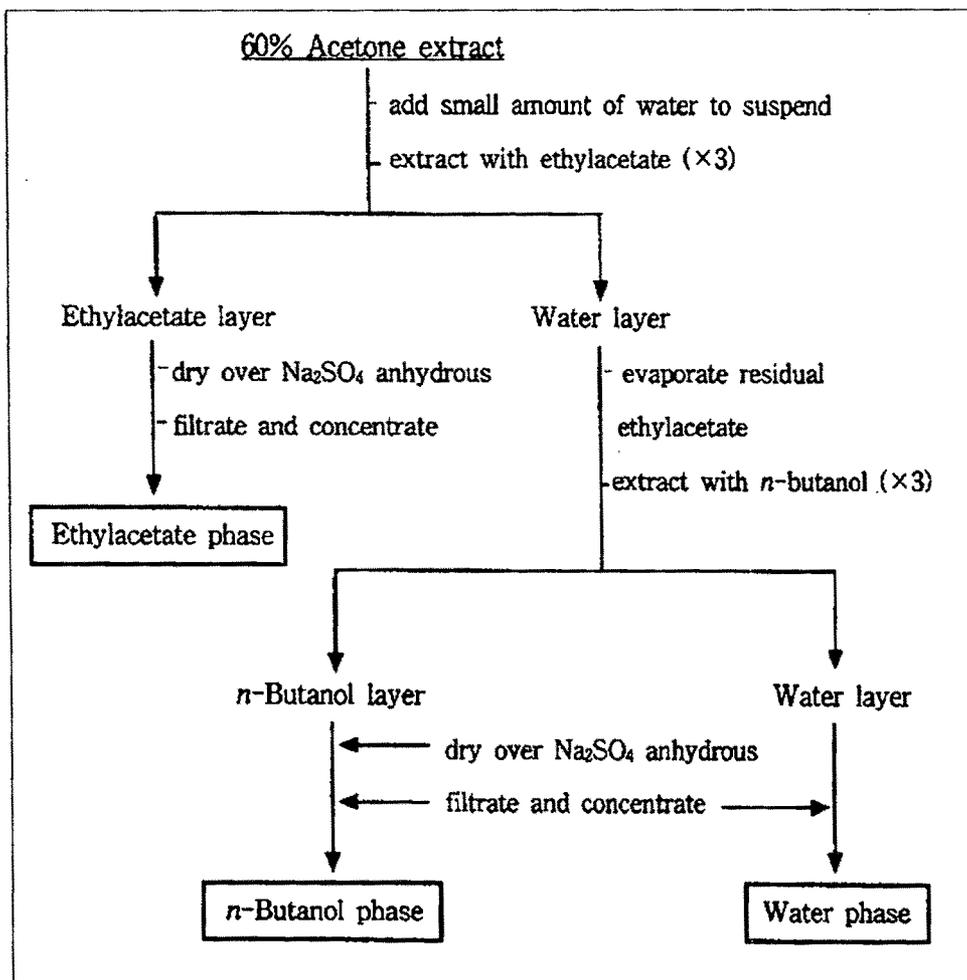


Fig.1. Solvent separation into water, ethylacetate and *n*-butanol from 60% acetone extract of *Nasturtium officinale*

6) Peptide-nitrogen 함량 측정

가수분해 시간 (1, 4, 8 및 24시간) 별로 시료 단백질의 peptide-nitrogen 생성량은 개량 biuret법⁵²⁾으로 측정하였다. 즉 배양 용액 중에서 10ml를 취하여 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상징액에 최종농도가 5%가 되게 20% TCA 용액을 가하여 효소 및 단백질을 침전시켰다. 이것을 다시 5,000 rpm에서 20분간 원심분리시키고 난 후 상징액만을 취하여 분액깔대기로 이행시키고 여기에 ether를 가하여 잔존 TCA를 제거시키고 단백질 가수분해 용액으로 하였다. 이 용액을 두 개의 시험관에 각각 0.5ml씩 취하고 증류수 4.5ml씩 가한 다음, 한 시험관에 biuret시약 I (CuSO₄ 0.4g, NaOH, 8.0g, glycerine 0.2g을 물 100ml에 녹임) 5ml를 첨가하여 A반응구로, 다른 시험관에는 biuret시약 II (NaOH, 8.0g, glycerine 0.2g을 물 100ml에 녹임) 5ml를 첨가하여 B반응구로 하였다. (이 때 공시험은 시료용액 대신에 증류수 5ml를 사용하였다.) 이것을 2시간 반응시킨 후, 545m에서 흡광도를 측정하여 식(1)에 의하여 가수분해 용액 중의 peptide-nitrogen 함량을 구하고, 식(2)에 따라 시료 단백질 당 peptide-nitrogen 함량을 구하였다.

● peptide-nitrogen 함량 (mg/ml) = (A-B) × 0.94 ----- ①

A : A반응구의 흡광도 (A반응구의 시료 흡광도-A반응구의 공시험 흡광도)

B : B반응구의 흡광도 (B반응구의 시료 흡광도-B반응구의 공시험 흡광도)

● mg peptide-nitrogen/mg protein

N × 희석 배수 × 가수분해용액(ml)

= ----- ②

시료 단백질(mg)

N : 가수분해용액 ml당 peptide-nitrogen 함량

7) 투석

동결건조시킨 단백질 가수분해물 시료 0.2g에 4ml의 증류수를 가하여 잘 교반한 후 투석 cell(ultrafree-4, Biomax 10, MWCO 10,000)에 넣어 7,500rpm에서 20분간 원심분리해서 얻은 내액과 외액을 각각 동결건조하여 투석시료로 사용하였다.

8) ACE 저해효과의 측정

ACE 저해효과 측정은 Cushman과 Cheung의 방법⁵⁾에 따라 행하였다. 즉 분말시료 100mg을 증류수 2ml에 잘 녹여서 50 μ l를 취하고 여기에 기질로써 Hip-His-Leu 용액 (25mg/2.33ml sodium borate buffer) 50 μ l 및 0.1M sodium borate buffer(pH 8.3) 100 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 preincubation 시켰다. 여기에 ACE 조효소액 50 μ l를 가하고 다시 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 뒤 1N-HCl 250 μ l로 반응을 정지시켰다 (blank는 시료 용액 대신에 증류수 50 μ l을 사용하고 control은 1N-HCl을 먼저 가한 다음 ACE 효소액 50 μ l를 가하였다). 여기에 ethyl acetate 1.5ml를 가하여 15초간 vortex 한 후 상층액 1.25ml를 취하였다. 이상층액을 105 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 완전히 건조시킨 후 증류수 1.5ml에 용해시키고 228nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 ACE 저해 활성을 계산하였다.

$$\bullet \text{ ACE inhibition(\%)} = \left(1 - \frac{S - S_c}{B - B_c} \right) \times 100$$

S : Sample의 흡광도

S_c : Sample의 대조군 (HCl에 의한 반응정지 후 효소를 넣은 군) 의 흡광도

B : Blank (Sample대신 증류수를 넣은 군) 의 흡광도

B_c : Blank 대조군의 흡광도

9) n-Butanol획분물로부터 ACE 저해물질의 분리 및 정제

돌미나리, 브로콜리 등 채소류의 ACE 저해물질에 대해 조 등⁴¹⁾ 방법을 변형한 각종 column chromatography 및 HPLC 시스템을 통하여 유효성분의 분획을 실시하였다. (Fig. 2)

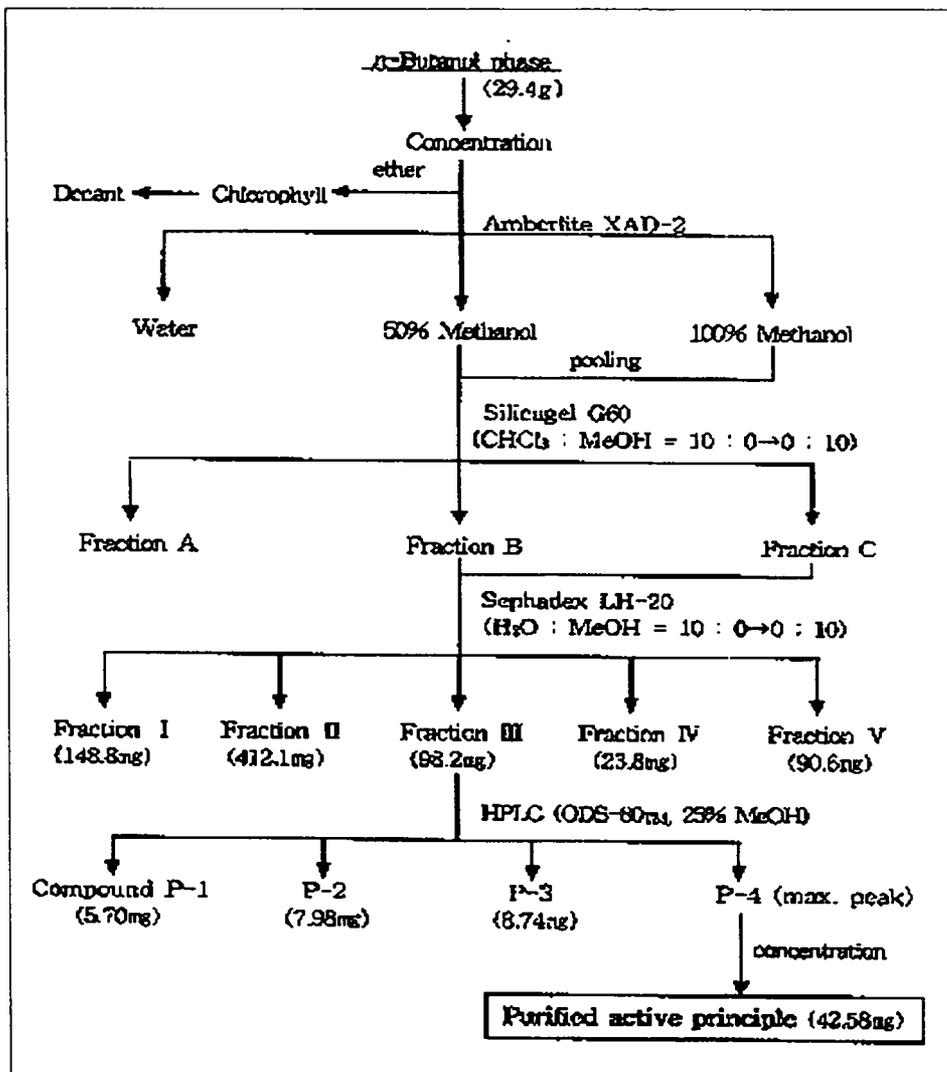


Fig 2. Isolation and purification procedure of ACE inhibitory compound from *n*-butanol phase of *Nasturium officinale*

(1) Amberlite XAD-2 column chromatography 에 의한 분리

돌미나리의 n-butanol 분획물로부터 chlorophyll을 제거한 후 Amberlite XAD-2 column chromatography를 행하였다. 즉 길이 35cm, 내경 4.5cm의 glass column에 물로 분산시킨 Amberlite XAD-2 (Sigma Co., H0558)를 충전 후 n-butanol 분획물을 소량의 물에 녹여 loading 하였다. 분획을 위한 용매로는 water 500ml, 50% methanol 500ml, 및 100% methanol 500ml를 순차적으로 사용하였다. 이 과정을 통하여 얻은 각각의 획분들을 rotary evaporator로 감압농축하여 ACE 저해효과를 측정하였다.

(2) Silicagel G 60 column chromatography 에 의한 분리

Silicagel G 60 column chromatography는 (1)에서 높은 ACE 저해활성이 확인된 50% methanol과 100% methanol 각각의 획분을 혼합하고 감압농축한 분획물을 사용하여 다음과 같이 행하였다. 즉 길이 28cm, 내경 3.6cm의 glass column에 chloroform으로 분산시킨 Silicagel G 60(Merk, 230-400mesh ASTM)을 충전하고, 그 위에 농축된 시료를 소량의 chloroform에 녹여 loading 하였다. Chloroform: methanol(10:0 → 0:10) 혼합용매를 전개용매로 하여 얻은 획분들에 대해 TLC로 분리상태를 확인하여 Rf 치가 비슷한 것들끼리 묶어서 3개의 fraction(A, B, C)을 얻었다. 이들을 각각 rotary evaporator로 감압농축한 뒤 ACE 저해효과를 측정하였다.

(3) Sephadex LH-20 column chromatography 에 의한 분리

Sephadex LH-20 column chromatography (2)에서 높은 ACE 저해활성이 확인된 fraction B와 C의 혼합 농축액을 대상으로 수행하였다. 즉 길이 15cm, 내경 3.6cm의 glass column에 물로 분산시킨 Sephadex LH-20(pharmacia, 25~100)을 충전하고, 여기에 농축된 시료를 소량의 물에 녹여 loading 하였다. 분획을 위한 1차용매는

water 200ml를 사용하였고, 2차는 water : methanol (9:1) 혼합용매 100ml를, 3차는 water : methanol 혼합용매를 8:2 비율로 100ml, 4차는 이를 7:3 비율로 100ml, 5차는 6:4 비율로 100ml, 그리고 6차는 methanol 200ml를 순차적으로 사용하였다.

이상에서 얻은 획분들을 TLC로 분리경향을 살펴 5개 fraction (I, II, III, IV, V)을 얻고 각각을 rotary evaporator로 감압농축한 뒤 ACE 저해효과를 측정하였다.

(4) High performance liquid chromatography(HPLC)에 의한 분리

Sephadex LH-20 column chromatography로부터 얻어진 5개의 획분 중 ACE 저해활성이 가장 높은 fraction III로부터 활성물질을 분리하기 위해 HPLC를 실시하였다.

즉 시료를 일정농도(0.5~1.0%)가 되게 HPLC급 methanol에 완전히 녹여 0.2 μ m membrane filter로 여과한 후 HPLC 시스템으로 분석하였다.

HPLC는 Waters 사의 model 510을 사용하였고 그 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. HPLC analysis conditions for separation of the active principle

Column	: ODS-80 TM (7.8 \times 300mm)
Eluent	: 25% methanol
Flow rate	: 2.2 ml/min
Detector	: UV absorbance (254 nm)
Controller	: isocratic
Pump	: 0~4000 psi

HPLC를 통한 fraction III의 분리과정으로부터 4개의 main peak compound(P-1, P-2, P-3, P-4)를 얻었으며, 각각을 분리하여 rotary evaporator로 감압농축시킨 후 이들의 ACE 저해효과를 측정하였다.

(5) Thin layer chromatography(TLC)에 의한 ACE 저해물질의 확인과 ninhydrin 발색 반응

분리 상태를 확인하기 위하여 단계별로 얻어진 각각의 획분에 대해 HPTLC plate(silicagel 60 F₂₅₄)를 이용하여 TLC를 행하였다. 전개용매로 chloroform : methanol : water(40 : 16 : 3) 혼합용매를 사용하였고, 약 40분간 전개한 후 UV lamp를 이용하여 발색 유무를 관찰하였다.

또한 앞에서 HPLC를 통하여 획득한 4개의 main peak compound에 대해서 TLC를 행한 후, 물질의 특성을 확인하기 위해 ninhydrin 발색반응을 관찰하였다. Peptide를 검출하는 ninhydrin reagent를 일정량 plate에 분무, 도포한 다음 vacuum drying oven에서 110°C, 15분간 방치하여 발색을 확인하였다.

(6) ACE 저해물질의 질량 및 구조분석

a) UV-spectrophotometer를 이용한 absorption scanning

돌미나리의 ACE 저해물질로 추정되는 compound p-4를 preparative HPLC로 순수 분리하여 재결정화시킨 다음, 10% methanol에 완전히 녹여 0.2 μ m membrane filter로 여과한 후 UV-VIS recording spectrophotometer를 이용하여 UV absorption scanning(200~285nm)을 실시하였다.

b) FAB-MS를 이용한 분자량 측정

Compound p-4의 분자량은 JEOL사의 FAB-MS 시스템을 이용하여 측정하였다.

이때 용매는 H₂O, reagent gas는 Xe를 사용하였고, 온도는 초기온도 25℃, 최고온도 320℃, 측정온도 30.1℃였으며, positive ion mode 상태에서 glycerol matrix(92n+1)를 기준물질로 하여 peak를 확인하였다.

c) NMR를 이용한 구조분석

최근에는 저분자 화합물의 구조분석시 대량의 시료가 요구되는 IR 보다는 소량의 시료를 필요로 하고 분석 후 시료의 회수가 용이하며, 보다 정확한 구조초정이 가능한 NMR을 많이 사용하고 있는 추세이다. ¹H-, ¹³C-, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY(HMQC) 및 HMBC(Hetro nuclear Multiple Bonding Connectivity) NMR(Bruker, AMS 500)은 각각 125MHz와 500MHz에서 측정하였으며, 이 때 온도는 30℃였다. 핵자기공명 흡수위치(chemical shift)는 시료 20mg을 DMSO-d₆에 녹여 측정한 후에 TMS(Tetramethylsilane)로 환산하여 나타내었다.

10) 단백질 가수분해물의 ACE 저해물질 분리 및 정제

두류, 어패류 등의 단백질 식품에서는 단백질을 효소 처리하여 가수분해시키고 그 분해물의 ACE 저해활성성분을 column chromatography 및 HPLC로 분리, 정제시킨다.

(1) Ultrafiltration

단백질 효소 가수분해물은 YM-10 membrane (MWC0. 10,000 cut off Amicon Co.,

USA)을 사용하여 냉장실내에서 한외 여과하고 냉장보관하여 사용하였다.³⁸⁾

(2) Ion exchange column chromatography에 의한 분리

한외여과한 액을 증류수 와 동일하게 pH를 맞추후 Sp Sephadex C-25 column (3.3 ×16cm)에 loading하고 증류수 200ml, 0.1M ammonian formate 400ml 및 0.5M ammonian formate 400ml로 차례로 용출시켜 18ml 분획하여 280nm에서 흡광도와 ACE 저해능을 측정하였다.

(3) ODS column chromatography에 의한 분리

Ion exchange column chromatography에서 용출된 ACE 저해활성 획분은 감압농축하여 증류수 일정량에 녹여내어 ODS-AQ 120-S50 column (1.7×20cm)에 loading하고, 0%, 20%, 40%, 60% 및 100% ethanol 용액 200ml로 각각 용출시키고 각 획분을 감압농축한 후 ACE 저해능을 측정하였다²³⁾.

(4) Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 분리

10% methanol로 충전한 Sephadex LH-20 column(2×80cm)에 ODS column에서 용출된 ACE 저해활성 획분을 loading하여 12ml/hr의 유속으로 4ml씩 분획하였고 280nm에서 흡광도와 ACE 저해능을 측정하여 ACE저해활성획분을 모아 감압농축하였다²²⁾.

(5) High performance liquid chromatography에 의한 분리

Sephadex LH-20 column에서 얻어진 활성획분을 HPLC를 이용하여 분, 정제하였다. 이때 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 2. HPLC conditions for purification of ACE inhibitors from protein hydrolysate.

Instrument	Water 501 and 510
Column	Capcell pak C ₁₈ UG120 S-5 μ m
Column size	10 × 250mm
Eluent	Acetonitrile (10-45%) Water (90-60%)
Flow rate	2.5ml/min
Detector	UV absorbance (220nm)
Sample size	0.5ml
Data module	Water 745 B

(6) ACE 저해물질의 동정

a) Electrospray를 이용한 분자량 측정

앞의 HPLC에서 얻은 ACE 저해활성획분인 peak p-p의 분자량은 LC- electrospray Mass-Spectrometer(Mass lynx, 2.1, Micromass platformII, Manchestic U.K)를 이용하여 측정하였다. 이때 용매는 H₂O : acetonitrile : formic acid (49.9 : 49.9 : 0.2)으로 사용하여 peak를 확인하였다.

b) 아미노산 조성

앞의 HPLC에서 얻은 ACE 저해활성획분에 6N-HCl을 가하여 24시간 가수분해한 후 진공пам프가 장착된 Pico-Tag workstation (Waters, USA)에서 건조한 후 HPLC 분석 (Hewlette Packard HPLC 1050)을 행하였다. 이때 사용한 column은 Pico Tag column (Waters, 3.8×150mm)으로, oven temp.는 43℃에서, detector의 흡광도는 UV 254nm

에서, flow rate는 1.0ml/min이었다.

C) 아미노산 서열의 분석

ACE 저해물질로 추정되는 peptide의 amino acid sequence의 분석은 protein sequenator (ABI 473A)를 사용하여 Edman 분해법으로 행하였다. 이때 분석의 처음은 도는 45℃, conversion일때는 64℃, HPLC 상태에서는 55℃였다. 흡광도는 269nm에서 측정하였으며 용매 A는 3.5%의 trifluoroacetic acid를 함유한 증류수를, 용매 B는 100% acetonitrile을 사용하였다.

제 3절. 결과 및 고찰

1. 채소류 및 차류의 ACE 저해효과

1) 물추출에 따른 ACE 저해효과

우리가 일상 식탁에서 많이 먹고 있는 채소류 33종을 물로 추출하여 얻은 물추출물에서 ACE 저해효과와 회수율을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

여기서 돌나물, 돌미나리, 마늘, 부추, 브로콜리, 파슬리의 경우 70%이상의 높은 ACE 저해율을 보였고, 그 다음 가지, 깻잎, 무, 등으로 높게 나타났다.

안³⁶⁾은 천연식품재료의 열수추출물로부터 ACE 저해활성을 측정하였는데, 마늘, 양파, 파, 생강에서는 본 실험에서보다 낮은 저해율을 보였고, Suzuki 등⁴⁴⁾의 보고에서는 파슬리, 가지, 썩갓, 부추, 마늘의 경우 본 실험결과보다 낮은 저해율을 보인 반면 토마토, 샐러리, 호박, 오이, 배추, 양배추, 시금치, 생강, 무청, 무, 파,

양파의 경우는 높게 나타났다. 도 등⁴⁶은 생강에서 47.9%의 저해율을 보여 본 실험에서와 비슷하였다.

건조된 실험재료의 일정량을 물로 추출하고 원심분리하여 얻은 상징액을 동결건조시켜 나오는 건물량으로 구한 각 시료의 수율을 보면 (Table 4) 호박, 마늘, 들나물, 양파, 브로콜리, 시금치, 오이, 파, 배추, 부추의 순으로 20%이상의 수율을 보였다. 이는 마늘 12.1%, 생강 7.3%, 양파 6.1%, 대파 2.3%의 수율을 보인 안¹⁾의 결과보다 높게 나타났다.

동량의 식품을 섭취한다해도 ACE 저해효과는 각 식품의 수율에 따라 달라질수 있으므로, 시료별로 수율에 따른 저해율(ACE 저해율 × 수율 / 100)을 보면, 마늘, 브로콜리, 들나물, 부추, 들미나리, 파의 순으로 높게 나타났다. 특히, 가지, 겨자, 무, 파, 호박은 ACE 저해능은 낮았으나, 수율이 높아서 동량을 섭취하였을 때는 높은 ACE 저해효과를 나타낸다고 볼수 있다.

그리고 차류에서 보면 홍차와 커피에서 ACE 저해효과가 50%이상 높게 나타났으나 나머지는 낮았다. Suzuki 등⁴⁴⁾의 보고에서 커피가 105.1%의 저해율을 보여 본 실험 결과보다 높게 나타났으나 일본차는 12.8%, 홍차는 11.6%로써 본 실험결과보다 낮게 나타났다.

본 실험에서 수율을 고려하여 식품을 동량으로 환산한 ACE 저해능은 커피가 57.78%로 현저히 높았고 그 다음은 쌍화차, 생강차의 순이었다. 또한, 홍차는 72.25%의 저해율을 보였으나 수율이 낮아 건증당으로서는 9.3%의 낮은 저해율을 나타내었다.

Table 4. ACE inhibitory activity of water extract from various vegetable a Tea

Sample		ACE	Yield(B)	A × B/100
Korean name	English name	inhibition(A)		(%)
가지	Egg plant	69.63	18.56	12.99
겨자잎	Horse leaf	9.90	9.60	0.95
갯잎	Perilla leaf	61.14	17.32	10.59
근대	Chard	16.77	8.04	1.35
노메인	Nomain	15.45	7.61	4.22
들나물	Sedum	81.63	25.56	20.86
들미나리	Small watercress	88.80	17.16	15.24
마늘	Garlic	76.53	30.60	23.42
무싹	Radish bud	15.45	3.10	0.48
무우	Radish root	63.76	18.10	11.54
무청	Radish leaf	38.12	13.46	5.13
배추	Chinese cabbage	23.44	21.76	5.10
보리고래	Borigole	16.83	17.16	2.89
부추	Leek	80.84	21.36	17.27
브로콜리	Broccoli	90.97	24.02	21.85
비타민	Vitamin	40.27	14.56	5.86
상치	Native lettuce	42.71	13.74	5.87
샐러리	Celery	22.35	12.14	2.71
생강	Ginger root	47.37	16.82	7.97
순무	Radish	22.51	7.90	1.78
시금치	Spinach	39.60	23.14	9.16
쑥갓	Crown daisy	52.82	12.14	6.41
양배추	Cabbage	55.80	7.52	4.20
양상치	Lettuce	2.33	10.46	0.24
양파	Onion	11.67	24.30	2.84
오이	Cucumber	28.82	22.94	6.61
취나물	Wild plant	40.36	14.58	5.88
컬리플라워	Cauliflower	41.85	16.82	7.04
케일	Kale	34.80	15.88	5.53
토마토	Tomato	11.00	13.96	1.54
파	Green onion	67.99	22.22	15.11
파슬리	Parsley	70.84	13.88	9.83
호박	Pumpkin	30.67	36.34	11.15
감잎차	Persimmon leaf tea	19.08	11.92	2.27

-continued

녹차	Green tea	26.01	14.52	3.77
보리차	Barley tea	15.03	15.00	2.25
쌍화차	Ssanghwa tea	15.16	100.00	15.61
생강차	Ginger tea	11.27	100.00	11.27
커피	Coffee	57.78	100.00	57.78
홍차	Black tea	72.25	12.88	9.31

2) 용매추출에 따른 ACE 저해효과

앞에서 물 추출시 70%이상의 강한 ACE 저해능을 보이는 채소류와 차류를 다른 유기용매 보다 수율이 높은 ethanol 과 methanol 로 추출하여 그 ACE 저해활성을 측정 한 결과는 Table 5와 같다.

여기서 보면 커피, 토마토는 물과 methanol보다는 ethanol 추출시 현저하게 높았으며 파슬리, 보리차, 녹차, 생강차, 감잎차, 쌍화차는 methanol 추출시 저해율이 높았다. 그러나 ethanol과 methanol 추출시는 물 추출시보다 수율이 현저하게 낮으므로 실제 수율을 고려한 같은 무게에서 보면 물 추출시보다 현저히 낮은 ACE 저해효과를 나타낸다고 할 수 있다. 도 등 ⁴⁶⁾ 의 보고에 의하면 결명자, 대추, 모과의 경우 물 추출시보다 ethanol 추출시 그 저해율이 높게 나타났고, 들깨, 오미자, 오갈피 및 생강에서는 물 추출시에 더 높게 나타난다고 하였다.

Table 5. ACE inhibitory activity of alcohol extract of various vegetables and instant teas

(%)

Sample	ACE inhibition(A)		Yield(B)		A×B/100	
	EtOH	MtOH	EtOH	MtOH	EtOH	MtOH
Sedum	42.58	0.58	3.33	0.43	1.42	0.003
Small watercress	8.99	30.41	2.67	2.90	0.24	0.88
Garlic	10.94	16.28	0.97	0.80	0.11	0.13
Leek	18.75	45.00	5.17	2.10	0.97	0.95
Broccoli	76.17	24.88	4.93	1.20	3.76	0.30
Onion	2.74	1.84	1.27	0.47	0.035	0.009
Tomato	37.50	0.58	1.97	0.83	0.74	0.005
Parsley	12.11	96.41	4.03	3.07	0.49	2.96
Persimmon leaf tea	3.72	23.96	5.60	1.50	0.21	0.36
Green tea	2.03	44.70	4.63	0.77	0.09	0.34
Barley tea	30.63	56.68	1.30	0.17	0.40	0.10
Ssang hwa tea	16.18	14.45	4.17	3.43	2.34	0.50
Ginger tea	10.40	40.17	3.83	3.40	0.40	1.37
Coffee	83.11	0.46	1.57	0.57	1.30	0.003
Black tea	N. D ^{*)}	25.58	N. D ^{*)}	0.37	N. D ^{*)}	0.09

N. D^{*)} : not detected

2. 곡류, 서류, 두류, 과실류 및 어패류의 ACE저해효과

1) 물 추출물의 ACE저해 효과

곡류, 서류, 두류, 과실류 및 어패류 등 총 63여종을 택하여 건조분말을 제조하고 물 추출물을 얻어 ACE저해능을 측정한 결과는 Table 6과 같다.

여기서 보면 곡류에서는 메밀, 귀리가, 두류에서는 팥, 동부, 강남콩, 대두가, 과실류에서는 머루, 파인애플, 키위가 그리고 어패류에서는 소라, 바지락, 모시조개의 순으로 ACE저해효과가 높게 나타났다.

Table 6. ACE inhibitory activity of water extract of various cereal
legume, fruit and fishes

Sample	ACE inhibition (%)	Sample	ACE inhibition (%)
메밀	61.00	잠두	6.86
귀리	51.73	잣	20.00
피	38.91	밤	14.10
현미	26.59	호두	30.03
흑미	24.24	머루	39.34
수수	23.11	파인애플	36.44
옥수수	16.33	키위	34.26
울무	10.54	대추	31.15
백미	9.54	메실	29.76
보리	9.43	아보카도	27.33
밀	8.40	포도	22.10
호밀	7.47	살구	20.22
조	5.84	자두	18.96
찹쌀	4.64	깡깡	16.95
고구마	12.25	복숭아	16.32
감자	11.40	메론	14.58
팥	61.96	앵두	14.29
동부	51.05	딸기	12.07
강낭콩	50.95	자몽	11.74
대두	50.86	배	11.50
땅콩	8.57	무화과	7.93

- continued

바나나	7.47	붕어	45.85
모과	5.90	병어	33.45
사과	4.54	도미	27.42
체리	4.02	소라	58.34
오렌지	1.35	모시조개	40.95
참외	0.61	바지락	40.20
감	0.48	가리비	36.71
고등어	38.53	꼬막	32.10
임연수	32.62	굴	25.48
멸치	21.14	우렁	19.02
대구	47.25	대합	18.10
조기	46.37	피조개	13.11
삼치	45.65	전복	4.87

2) 유기용매 추출물의 ACE저해효과

앞의 물추출시 ACE저해효과가 높은 10종의 시료를 택하여 유기용매 ethanol, methanol, ethylether, chloroform, ethylacetate로 추출하여 각각의 가용성획분과 불용성획분의 ACE 저해효과를 측정하여 Table 7과 같은 결과를 얻었다.

여기서 보면, 가용성 추출물에서 ACE 저해효과가 현저하게 높게 나타났고 용매별로 보면 팔은 ethanol, ethylether 추출물에서, 동부는 ethylether 추출물에서, 그리고 강낭콩은 ethylether, methanol, ethanol 추출물에서 물 추출시 보다 높게 나타났으나 그 외의 것들은 물 추출시보다 낮게 나타났다.

Table 7. ACE inhibitory activity of solvent extracts from various food materials

Sample	ACE inhibition									
	Ethanol		Methanol		Ethylether		Chloroform		Ethylacetate	
	Souble	Insouble	Souble	Insouble	Souble	Insouble	Souble	Insouble	Souble	Insouble
팥	81.55	0.75	45.57	-	81.64	4.05	61.45	-	52.76	-
동부	-	2.24	0.32	-	87.00	2.55	-	0.28	52.72	-
강남콩	75.08	-	87.08	-	88.12	-	56.98	4.22	59.87	0.97
대두	6.16	-	38.65	-	8.2	-	28.08	-	6.16	-
소라	52.59	0.16	14.82	-	9.37	9.16	13.35	-	14.59	-
바지락	15.45	-	20.01	4.89	10.28	-	8.32	2.91	32.90	-
모시조개	19.52	17.51	-	-	-	8.28	-	18.82	10.91	6.68
가리비	1.77	8.21	-	2.53	-	10.83	31.11	10.07	12.37	14.66
고등어	-	-	19.17	11.16	9.51	-	7.52	4.71	19.24	-
키위	13.33	-	26.30	-	27.78	-	21.85	-	35.56	17.20

S : Souble fraction of solvent extracts

i : Insouble fraction of solvent extracts

- : negative

3) 투석 및 가열시의 ACE 저해효과

물 추출물에서 ACE 저해효과가 높은 순으로 25개 시료를 택하여 분자량에 따른 ACE 저해효과를 비교하기 위하여 분자량의 cut off가 10,000인 막을 이용하여 투석을 행하여 내액과 외액을 각각 동결 건조시킨 후 ACE 저해효과를 측정한 결과로 Table 8과 같다.

여기서 보면, 파인애플과 머루의 경우는 내액, 외액에서 큰 차이를 보이지 않았지만 그 외에는 내액에서 보다 외액의 저분자 물질에서 ACE 저해효과가 높게 나타났다.

또한 ACE 저해물질의 온도에 대한 안전성을 알아보기로 곡류, 두류, 과실류, 어류, 패류에서 각각 두가지 씩 선택하여 50℃와 100℃에서 가열한 후 ACE 저해효과를 측정한 결과는 Table 9와 같다.

여기서 보면 임연수, 고등어, 소라, 모시조개 및 귀리 등에서는 100℃ 가열 후에도 큰 차이가 없어 열에 안정한 것으로 나타났고, 메밀과 팥에서는 차이를 보였다.

Table 8. ACE inhibitory activity of dialysis fraction from various food materials

(%)

Sample	Dialysis fraction	
	inner solution	outer solution
메밀	78.13	85.44
귀리	23.84	45.07
피	20.05	31.05
현미	8.48	15.24
흑미	72.21	90.99
옥수수	73.44	68.57
올무	40.17	51.58
고구마	10.71	48.09
감자	15.66	29.83
팥	85.16	100.0
동부	38.78	94.14
강낭콩	75.59	91.99
대두	50.86	94.30
잣	69.53	83.01
밤	14.10	77.55
호두	37.74	42.82
머루	38.29	40.32
파인애플	33.58	39.48
키위	63.29	97.82
대추	29.90	89.32
고등어	47.96	94.49
임연수	50.04	96.33
소라	17.73	85.44
모시조개	23.70	93.77
바지락	18.06	42.97
가리비	16.82	36.71

**Table 9. The changes in ACE inhibition of various food material
by heating**

Sample	ACE inhibition (%)			
	Before(50℃)	Yield	After(100℃)	Yield
메밀	58.03	11.34	45.54	9.53
귀리	42.97	10.28	40.24	9.87
강낭콩	67.29	15.71	59.55	14.25
팥	61.48	16.48	51.34	9.37
키위	38.68	6.43	32.54	4.28
머루	30.02	7.55	28.54	5.49
임연수	38.04	8.78	33.40	6.99
고등어	43.52	9.21	37.62	7.56
소라	66.45	9.90	75.84	8.61
모시조개	45.27	7.38	40.48	5.81

3. 소라의 ACE 저해물질 분석

패류의 물추출물에서 ACE 저해율이 가장 높은 소라(turban shell, Turbo cortunus)를 사용하여 효소별 소라단백질의 가수분해물과 그들의 투석물, 그리고 column chromatography에 의한 단백질 가수분해물의 분획별 ACE 저해능을 측정하고 단백질 가수분해물을 Gel filtration, TLC, HPLC 등으로 분리 정제한 ACE 저해물질의 특성을 알아보려고 하였다.

1) 소라의 물 추출물 및 유기용매 추출물의 ACE 저해효과

패류의 물 추출물에서 소라가 가장 높은 ACE 저해율을 보이었고(Table 6.) 각종 유기용매 추출에 따른 ACE 저해효과도 Table 7과 같다.

2) 효소 가수분해에 따른 ACE 저해효과

(1) peptide-nitrogen 함량과 ACE 저해효과

시료 단백질에 종류수를 가하여 현탁한 뒤 효소에 따라 pH와 온도를 달리하면서 pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, alcalase, bromelain, papain 및 pancreatin을 각각 제품 중량 기준으로 1% 농도로 첨가하고 가수분해 시간에 따른 peptide-nitrogen의 생성량을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다.

여기서 보면 bromelain을 제외한 다른 효소들은 일반적으로 가수분해 8시간까지는 급격히 증가하였고 그 이후는 약간의 감소 또는 큰 변화가 없었다.

그리고 단백질 가수분해 시간에 따른 ACE 저해를 보면 Table 10 과 같이 8시간에서 가장 높게 나타났으며, 그 후에는 감소 또는 큰 변화가 없었다.

그 중에서 alcalase로 분해시켰을 때 peptide-nitrogen 생성량과 아울러 ACE 저해활성도도 가장 높게 나타났다.

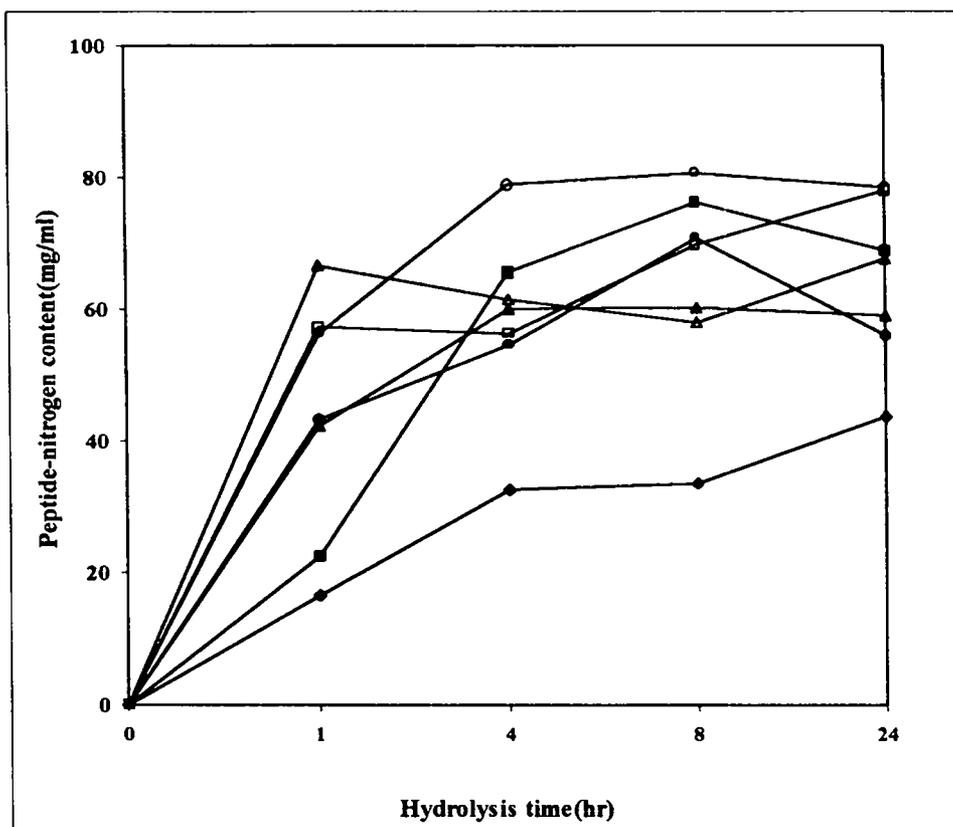


Fig. 4 The changes in peptide-nitrogen content of turban shell protein hydrolysate by various protease during hydrolysis time.

- : pepsin (pH 2.0, 37°C, 600unit/mg)
- ▲-▲ : trypsin (pH 7.0, 37°C, 0.6unit/mg)
- : α -chymotrypsin (pH 7.0, 37°C, 38unit/mg)
- : alcalase (pH 7.0, 60°C, 1.94×10^4 unit/mg solid)
- △-△ : bromelain (pH 6.0, 35.5°C, 2unit/mg)
- : papain (pH 6.2, 25°C, 2.1unit/mg)
- ◆-◆ : pancreatin (pH 8.0, 37°C, 52unit/mg)

Table 10. ACE inhibitory activity of turban shell protein hydrolysate at various proteases during hydrolysis time.

Enzyme	ACE inhibition(%)			
	1hr	4hr	8hr	24hr
Pepsin	36.92	39.32	45.79	38.00
Trypsin	15.78	42.07	44.23	39.43
α -chymotrypsin	17.52	36.11	46.84	41.72
Alcalase	51.70	64.25	67.82	79.58
Bromelain	35.78	32.07	43.79	46.71
Papain	37.62	36.13	39.15	40.25
Pancreatin	13.56	19.68	35.15	40.35

이것으로 보아 가수분해 중에 생성되는 peptide 함량과 ACE 저해효과 사이에는 밀접한 상관관계가 있는 것으로 사료된다. 염⁴⁸⁾도 대두 단백질의 가수분해시간에 따른 ACE 저해작용은 8시간까지는 급격히 증가하는 경향을 보이었으나, 그 이후는 완만하게 증가하든지 또는 감소된다고 하며 본 소라 단백질에서와 같은 경향이었으나 egg albumin 및 casein에서는 trypsin이나 α -chymotrypsin에 의한 가수분해에서 가수분해시간 8시간을 경과함에 따라 ACE 저해작용이 현저하게 감소된다고 하여 본 시료와는 약간 다르게 나타났다.

효소종류에 따른 단백질 가수분해물의 ACE 저해효과를 살펴보면 8시간 동안 단백질을 가수분해하였을 때 효소제품의 증량기준으로 그 중에서 alcalase에 의한 가수분해물이 ACE 저해효과가 가장 높게 나타났으며 그 다음 α -chymotrypsin > pepsin > trypsin 등의 순으로 높게 나타났고, Papain과 pancreatin에서는 가장 낮았다.

염 등⁴⁸⁾도 alcalase와 bromelain에 의한 가수분해시 ACE 저해작용과 가수분해율이 가장 크게 나타났다. Seki 등⁴⁹⁾은 정어리 가수분해 효과에서 pepsin에 의한 가수분해물이 가장 높은 저해효과를 보인다고 하였고, Miyoshi 등²¹⁾은 옥수수 내유 가수분해 효과에서 thermolysis에 의한 가수분해물이 가장 높은 저해효과를 나타낸다고 보고하였다.

안 등³⁷⁾도 대두가수분해효소에 따른 ACE 저해효과에서 trypsin, protease(Bacillus subtilis) 그리고 hot water extract에서 높게 나타난다고 하였다. 이는 ACE의 active site에 관여하는 C-말단의 두 amino acid에 대한 기질 특이성과 관련이 있는 것으로 보여진다.¹²⁾

3) Gel filtration를 통해 분리된 단백질 가수분해물획분의 ACE 저해효과

효소 가수분해시 ACE 저해효과가 높았던 pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, alcalase 4종류의 효소를 사용하여 소라 단백질을 가수분해하고 Bio-gel P-2로 gel filtration 하였을 때 5~7개의 peak를 얻었고 (Fig. 5~8), 분리된 각 peak들의 ACE 저해효과를 측정한 결과는 Table 11와 같다.

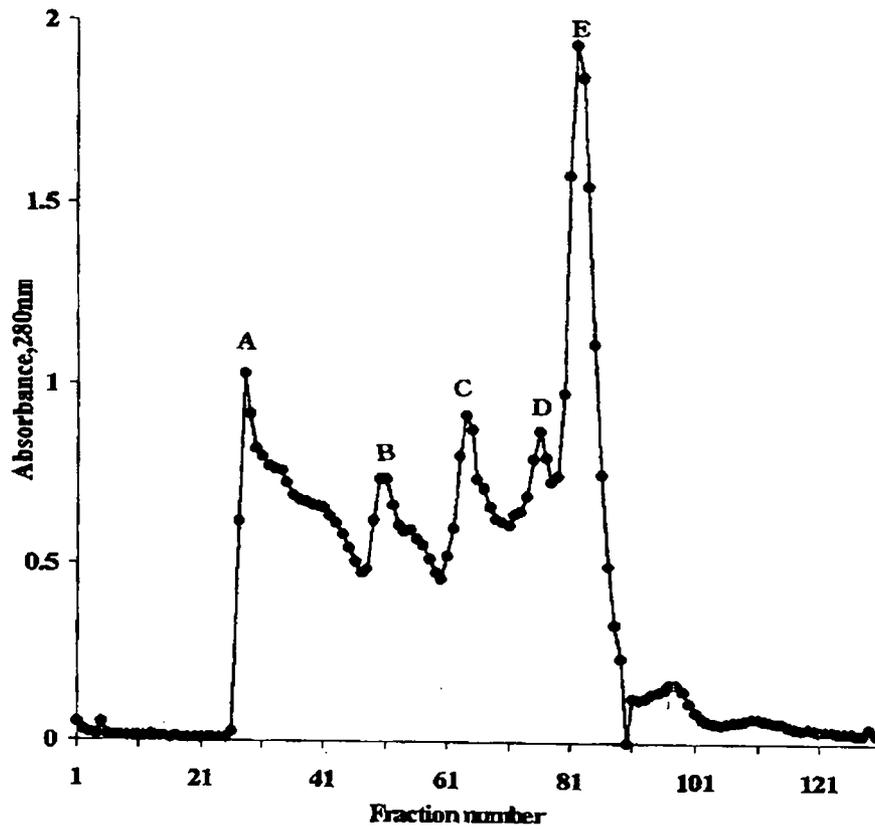


Fig. 5 Gel filtration pattern on Bio-gel P-2 of turban shell protein hydrolyzed with pepsin.

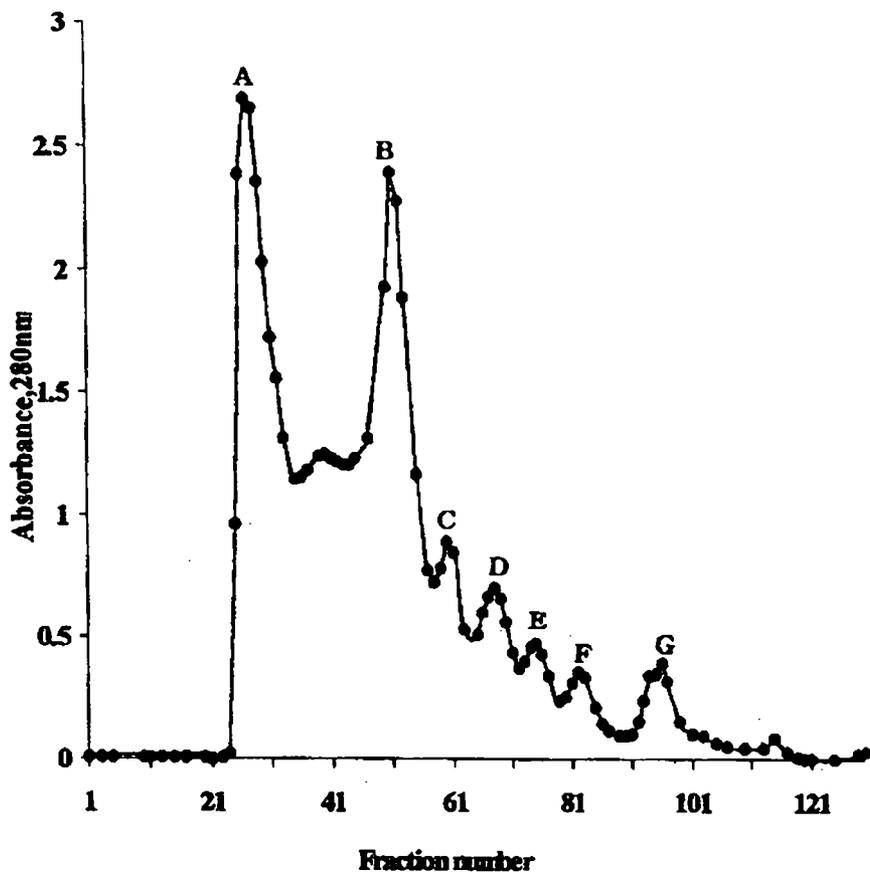


Fig. 6 Gel filtration pattern on Bio-gel P-2 of turban shell protein hydrolyzed with trypsin.

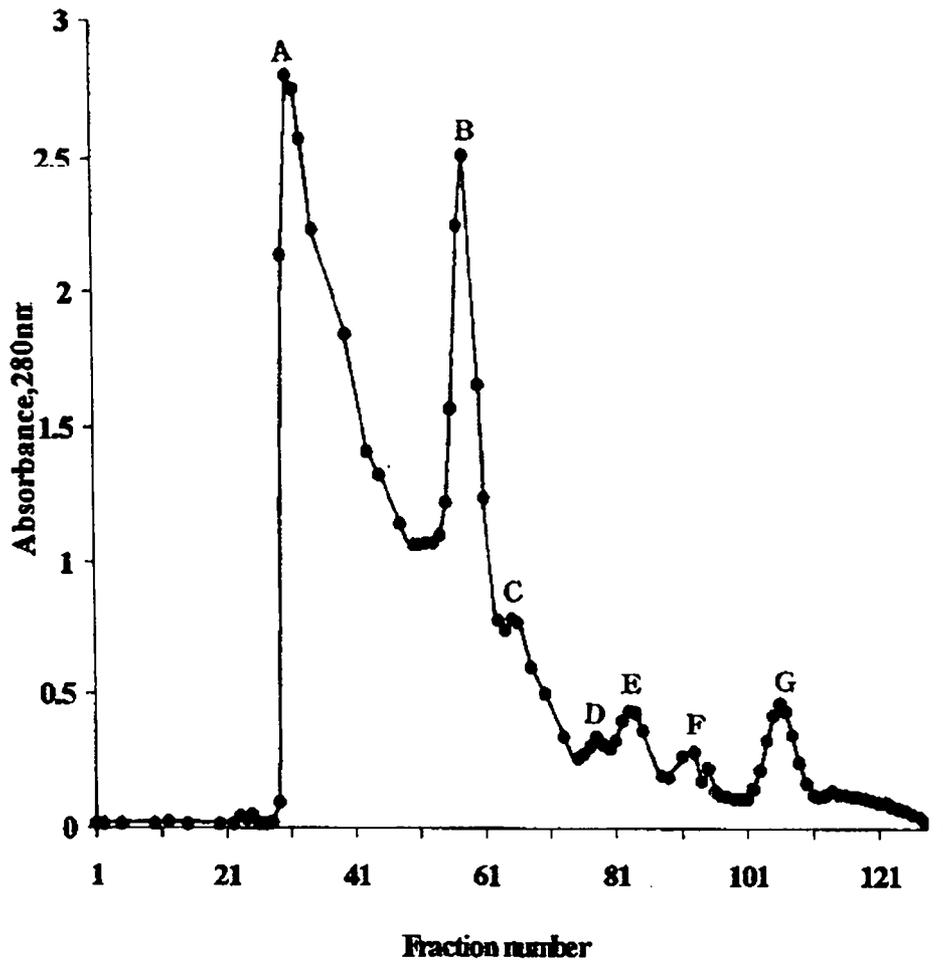


Fig. 7 Gel filtration pattern on Bio-gel P-2 of turban shell protein hydrolyzed with α -chymotrypsin.

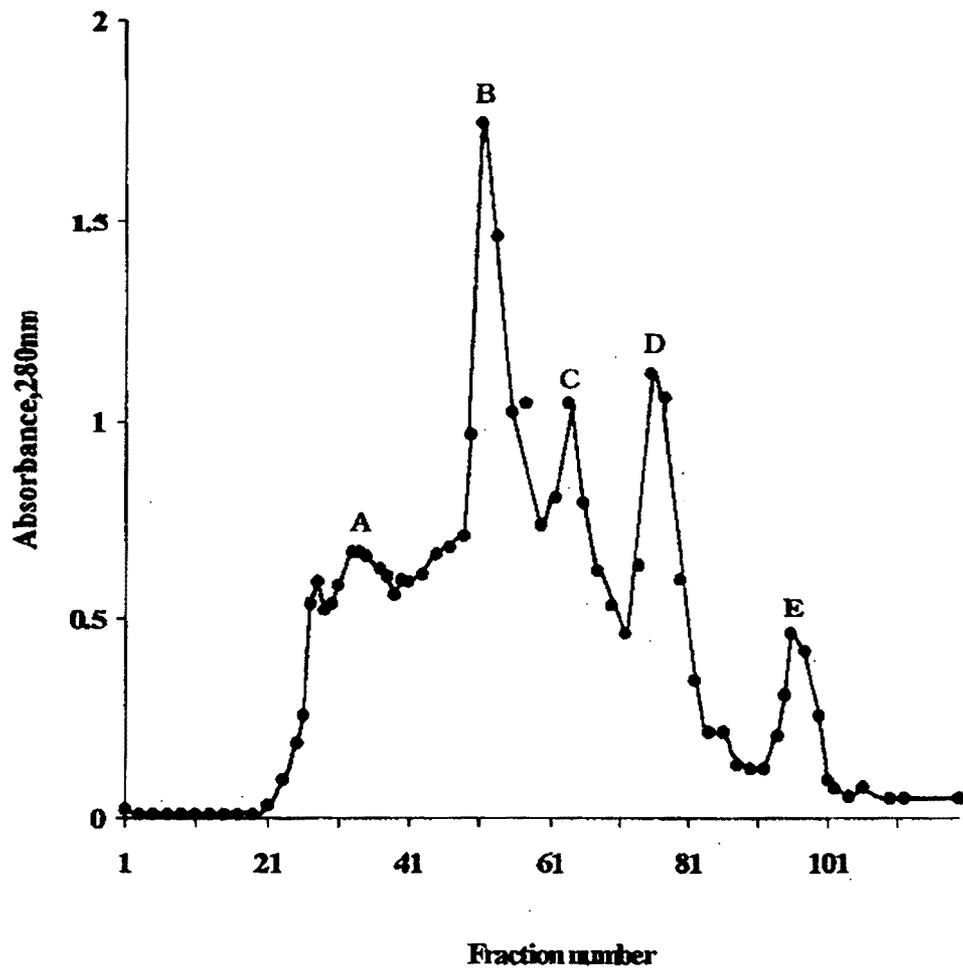


Fig. 8 Gel filtration pattern on Bio-gel P-2 of turban shell protein hydrolyzed with alcalase.

Table 11. ACE inhibitory activity of peaks of turban shell protein hydrolysate seperated on Bio-gel p-2 column.

(%)

Enzyme	Peak No.	(Fraction No.)	ACE inhibition
Pepsin	Peak A	(Fraction No. 26-47)	63.60
	Peak B	(Fraction No. 48-60)	82.74
	Peak C	(Fraction No. 61-71)	73.39
	Peak D	(Fraction No. 72-78)	95.65
	Peak E	(Fraction No. 79-93)	-
Trypsin	Peak A	(Fraction No. 30-51)	59.68
	Peak B	(Fraction No. 52-64)	79.84
	Peak C	(Fraction No. 67-75)	91.13
	Peak D	(Fraction No. 76-80)	59.68
	Peak E	(Fraction No. 81-89)	81.72
	Peak F	(Fraction No. 95-102)	37.64
	Peak G	(Fraction No. 103-112)	23.12
α -chymotrypsin	Peak A	(Fraction No. 25-43)	43.20
	Peak B	(Fraction No. 44-58)	60.57
	Peak C	(Fraction No. 59-65)	83.29
	Peak D	(Fraction No. 66-72)	86.12
	Peak E	(Fraction No. 73-80)	97.48
	Peak F	(Fraction No. 81-85)	-
	Peak G	(Fraction No. 92-100)	-
Alcalase	Peak A	(Fraction No. 31-40)	83.99
	Peak B	(Fraction No. 50-58)	54.63
	Peak C	(Fraction No. 61-70)	63.64
	Peak D	(Fraction No. 74-80)	80.31
	Peak E	(Fraction No. 93-100)	32.90

여기서 보면 pepsin을 사용하여 얻은 5개 Peak (Fig. 5)의 ACE 저해효과를 보면 (Table 9) Peak D (Fraction No 72-78)가 95.65%로 가장 높았으며 Peak E는 저해효과가 거의 나타나지 않았다. trypsin을 사용한 경우는 7개 Peak가 얻어졌고 (Fig. 6), Peak C (Fraction No 67-75)가 91.13%로 가장 높게 나타났으며 α -chymotrypsin의 경우도 7개의 Peak를 얻었고(Fig. 7), 그 중 peak E가 97.48%로 가장 높게 나타

났다. alcalase을 사용한 경우는 5개의 Peak (Fig. 8)중에 Peak A (Fraction No 31-40) 와 Peak D (Fraction No 74-80)의 양쪽에서 높게 나타났다.

이상의 결과에서 효소별 소라단백질 가수분해물 분획물은 공히 Fraction No 70-80 범위의 서로 비슷한 분자량을 갖는 획분에서 ACE 저해효과가 높게 나타났다. 그리고 이들의 분자량을 추정하기 위하여 vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin ; MW 1,355.4)을 사용하여 위와 같은 조건으로 분획하였을 때, Fraction No 40-50에서 최대 Peak를 나타내었으므로 본 소라단백질 분획물 중 ACE 저해물질 (Fraction No 70-80)은 분자량 1,355.4)보다 더 작은 peptide일 것으로 추정되었다.

김 등²⁴⁾은 멸치젓갈 분해물의 gel filtration (Bio-gel p-2)에 의한 획분별 ACE 저해효과는 전반적으로 Fraction No 32-44 범위에서 크다고 보고하였고 염 등⁴⁶⁾도 탈지대두박, egg albumin 및 casein 가수분해물의 gel filtration에 의한 획분별 ACE 저해작용은 전반적으로 Fraction No 40을 전후해서 높다고 하였고, 이들 ACE 저해획분의 분자량은 약 1,400부근인 것으로 추정하였다.

안 등³⁷⁾도 대두단백질 가수분해물을 Sephadex column chromatography 하였을 때 Fraction의 뒷부분 즉 중간크기의 peptide에서 ACE 저해활성이 크게 나타낸다고 하여 본 실험의 소라에서와 유사한 경향이었다.

앞의 실험에서 ACE 저해효과가 가장 높았던 alcalase의 5개 peak를 TLC 해본 결과는 Fig. 9와 같았다.

여기서 보면 ACE 저해활성이 83.99%인 peak A 에는 여러 가지 성분이 혼합되어 나타났고, 활성이 54.63% 인 peak B에는 4개의 성분으로 분리되었고, 활성이 63.64% 인 peak C, 80.31% 인 peak D, 활성이 32.9%로 가장 낮은 peak E 는 각각 1개의 단일 성분으로 나타났다. 그리고 이들은 ninhydrin 반응으로 peptide 임이 밝혀졌다. 소라단백질의 alcalase 가수분해물을 Bio-gel p-2로 gel filtration하여 얻은 peak D (Fig. 8)을 HPLC 한 결과는 Fig. 10과 같이 ACE 저해활성이 높은 단일 peptide로 얻어졌다.

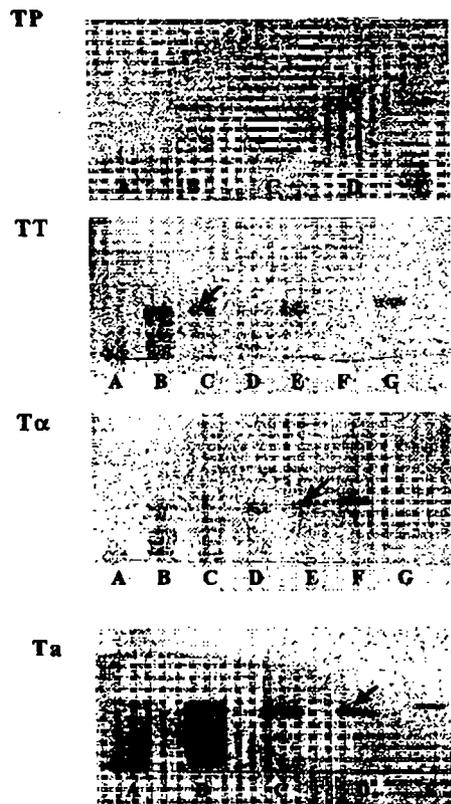


Fig. 9 TLC patten of peak from gel filtration(Bio-gel p-2) protein hydrolysates.

- TP : Pepsin hydrolysate of turban shell protein
- TT : Trypsin hydrolysate of turban shell protein
- T α : α -chymotrypsin hydrolysate of turban shell protein
- Ta : Alcalase hydrolysate of turban shell protein
- ✓ indicate band exhibiting higher ACE inhibition

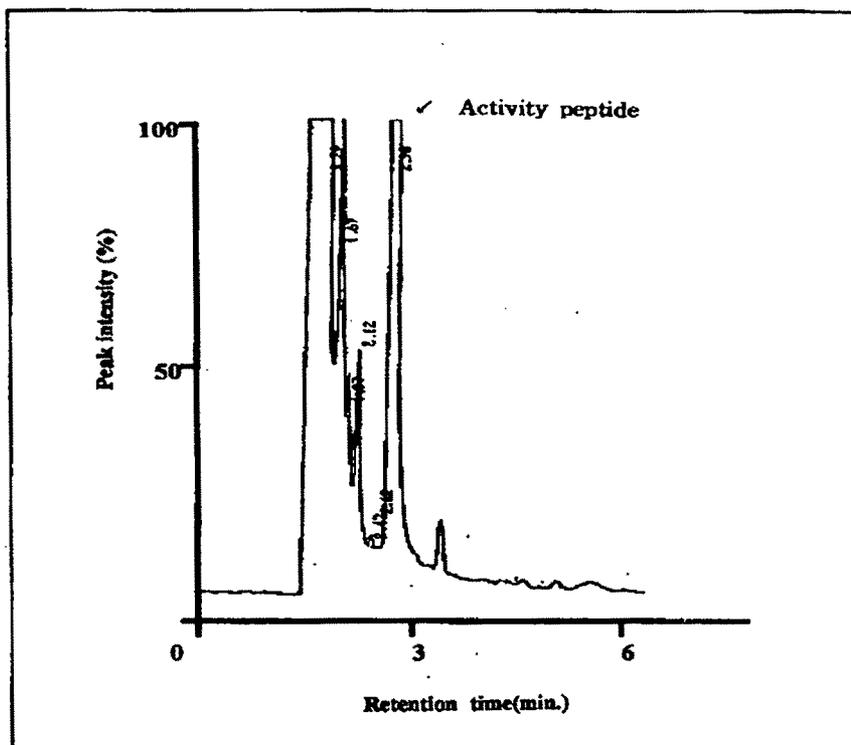


Fig. 10 HPLC chromatogram of ACE inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of turban shell protein.

Symmetry C18 (3.9×150mm)

Solution : 20% MeOH

Flow rate : 0.8ml/min

UV : 214nm

✓ indicate peak D (ACE inhibitory peptide)

4) 정제된 ACE 저해물질(peptide)의 아미노산 조성

소라 단백질의 alcalase 가수분해물을 gel filtration(Bio-gel p-2)하여 얻은 peak D을 TLC 로 확인하고 HPLC로 분리정제하여 ACE 저해활성이 높은 단일 peptide 성분을 얻었으며 이의 아미노산 조성을 보면 Table 12 와 같다.

여기서 보면 phenylalanine, valine, proline의 순으로 함유되어 이들 아미노산을 포함한 peptide가 ACE 저해효과가 있다는 것으로 나타났다.

수전(受田) 등⁴⁾은 정어리 단백질 가수분해물에서 ACE 저해 peptide 는 lysine 함량이 적고, trosine, leucine 및 phenylalanine 등의 소수성 아미노산 함량이 많은 것으로 보고하였으며 ACE 저해효과를 보이는 peptide의 아미노산분석에서 주로 방향성 및 소수성 아미노산이 많음을 보고하였다.

Table 12. Amino acid composition of ACE inhibitory peptide from turban shell hydrolysate

Amino acid	Concentration (μ mole/ml)
Glu	0.15
Ser	0.05
Thr	0.18
Ala	0.06
Pro	0.48
Tyr	0.02
Val	0.54
Cys	0.34
Ile	0.27
Leu	0.24
Phe	3.72
SUM	6.05

4. 돌미나리의 ACE 저해물질 분석

채소류 중 ACE 저해활성이 높은 돌미나리(*small watercress*, *Nasturtium officinale*)의 ACE 저해활성 성분분석을 하고자 추출, 용매분획, 각종 column chromatograph, TLC 및 HPLC을 실시하며 ACE 저해물질을 분리, 정제하였다. 또한 이 화합물을 UV, FAB-MS 및 NMR spectrometry 등으로 화학구조를 분석하였다.

1) 돌미나리의 용매별 분획

돌미나리의 60% acetone 추출물을 water, ethylacetate 및 *n*-butanol로 분획하여 ACE 저해활성을 측정한 결과는 Table 13와 같다.

Table 13. Yield, ACE inhibition ratio* and IC₅₀ of 60% acetone, water ethylacetate and *n*-butanol extracts of *Nasturtium officinale*.

Solvents	Yield (%)	Inhibition ratio	IC ₅₀ (μg)
60% Acetone	32.11	52.32	239
Water	67.88	21.67	577
Ethylacetate	8.03	-23.48	-
<i>n</i> -Butanol	24.09	62.48	201

*Each sample amount used in this experiment is 250μg/250μl

돌미나리의 60% acetone추출물의 ACE 저해활성은 52.32% 였으며 용매별분획중에는 *n*-butanol 분획에서 이보다 높은 활성(62.48%)을 나타내었고, 각각의 분획은 *n*-butanol > water > ethylacetate 의 순으로 강한 활성을 보였다. 또, 활성이 가장 낮았던 ethylacetate 분획은 수율도 8.03%로 낮았고, 물 분획은 67.88%의 높은

수율을 보였으나 활성이 21.67%로 낮아 ACE 저해물질로서의 가치가 적은 것으로 여겨진다.

한편, 들미나리의 60% acetone 추출물, water 및 *n*-butanol 분획에 대한 IC₅₀ (ACE의 활성을 50% 억제할 수 있는 저해제의 양) 은 *n*-butanol 획분 (IC₅₀ =201 μ g) 이 water 획분 (IC₅₀ =577 μ g)에 비래 월등히 낮아 대부분의 활성이 *n*-butanol획분에 존재하는 것으로 확인되었다.

또 *n*-butanol획분의 IC₅₀은 茶 등⁴⁰⁾의 연구에서 ACE 저해효과가 확인된 유리상태의 theaflavin의 값 (IC₅₀ =400 μ g)보다 훨씬 낮은 것으로 나타나 ACE 저해제로서의 가능성을 입증하였다.

2) 단계별 column chromatography를 통해 분리된 유효성분 분획의 ACE 저해효과

대량으로 제조된 들미나리의 *n*-butanol fraction을 사용하여 amberlite XAD-2 column chromatography를 행하였다. 여기서 얻은 water, 50% 및 100%-methanol fraction에 대하여 ACE 저해효과를 측정된 결과는 Fig. 11과 같이 50% methanol과 100% methanol fraction에서 각각 73.05%와 74.92%의 높은 활성을 나타내었다. 수율면에서 67.34%로 water fraction이 가장 높았으나 ACE 저해활성이 낮아서 이용성이 적은 것으로 사료된다. ACE 저해활성이 확인된 50%와 100%-methanol fraction의 혼합농축물에 대해 Silicagel G60 column chromatography를 수행한 결과 3개의 획분 A, B 및 C를 얻었다. (Fig. 12) 이들에 대한 ACE 저해효과 측정에서 획분 B와 C가 80.72%, 70.42%로 강한 활성을 보였으며, 이중 획분 B의 경우에는 88.79%의 높은 수율을 나타내었다.

ACE 저해효과가 높은 획분 B와 C를 혼합하여 감압농축한 분획물을 Sephadex LH-20 column chromatography를 행하여 5개의 획분 I, II, III, IV 및 V를 얻었으며 (Fig. 13) 이들에 대한 ACE 저해효과 측정에서 획분 III이 82.74%로 가장 높은 저해효과를 보였다.

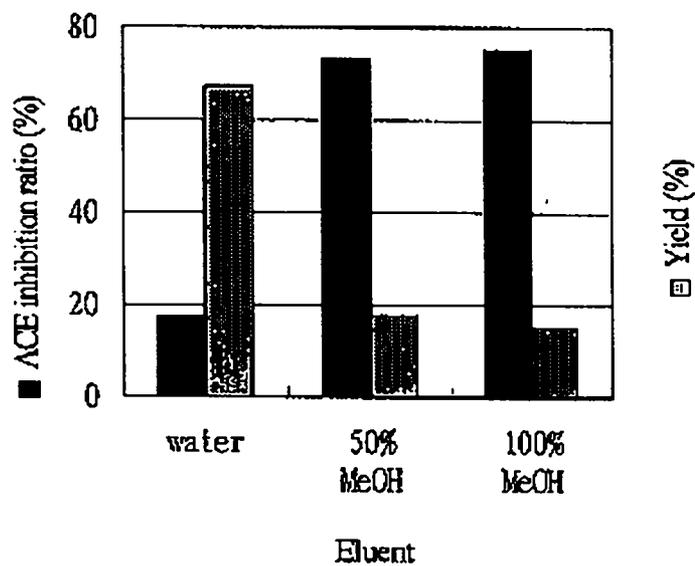


Fig.11 ACE inhibition ratio and yield of eluents obtained from amberlit XAD-2 column chromatography.

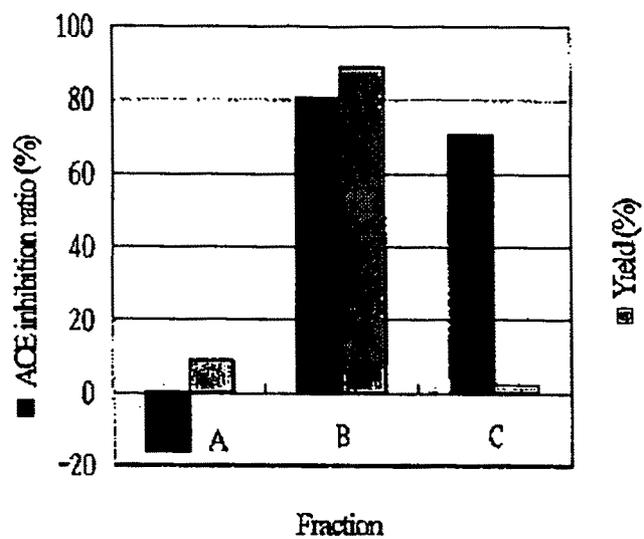


Fig.12 ACE inhibition ratio and yield of fractions obtained from silicagel G60 column chromatography.

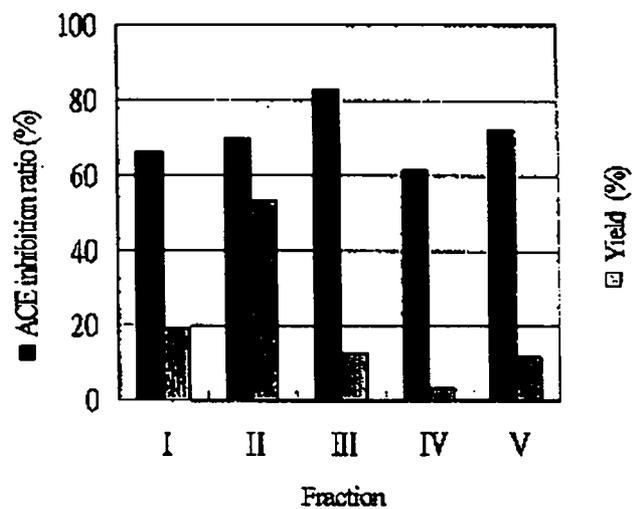


Fig.13 ACE inhibition ratio and yield of fractions obtained from sephadex LH-20 column chromatography

3) HPLC에 의한 유효성분의 정제

Sephadex LH-20 column chromatography에서 얻은 획분Ⅲ으로부터 ACE 저해활성 성분의 순수분리를 위해서 HPLC를 수행하였다. (Fig. 14)

여기서 나타난 4개의 main peak P-1, P-2, P-3 및 P-4를 분취, 이를 농축하여 AEC 저해 활성을 측정한 결과(Fig. 15) P-4가 92.0%로 가장 높은 활성을 보였고, 수율도 65.50%로 가장 높았다.

이 수율은 본 실험에 사용된 60% acetone 추출물의 수율을 100%로 했을 때 0.035%에 해당하는 것이며, 이상의 결과에서 정제가 진행될수록 ACE 저해물질의 수율은 급격히 감소하나 순도가 높아져 저해효과가 증가함을 알 수 있다. (Table 14)

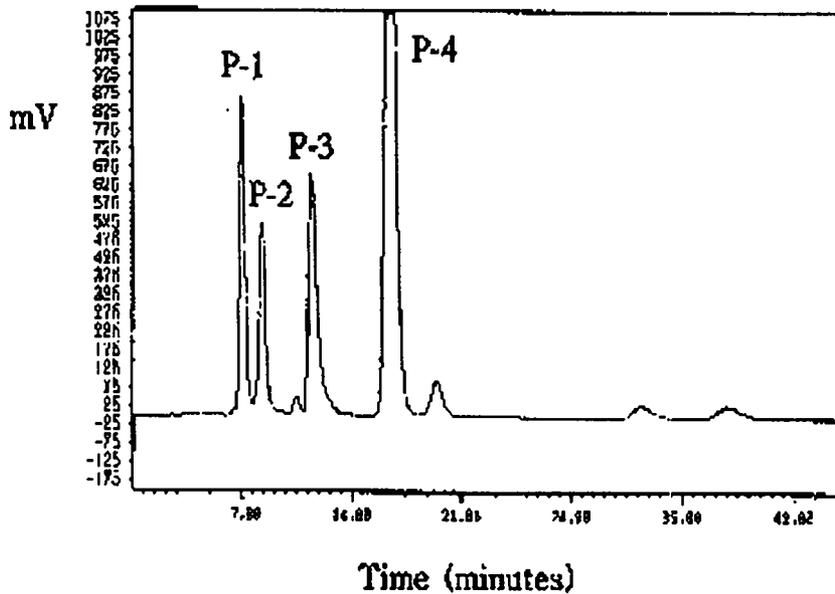


Fig. 14. HPLC chromatogram of fraction III obtained from sephadex LH-20 column chromatography

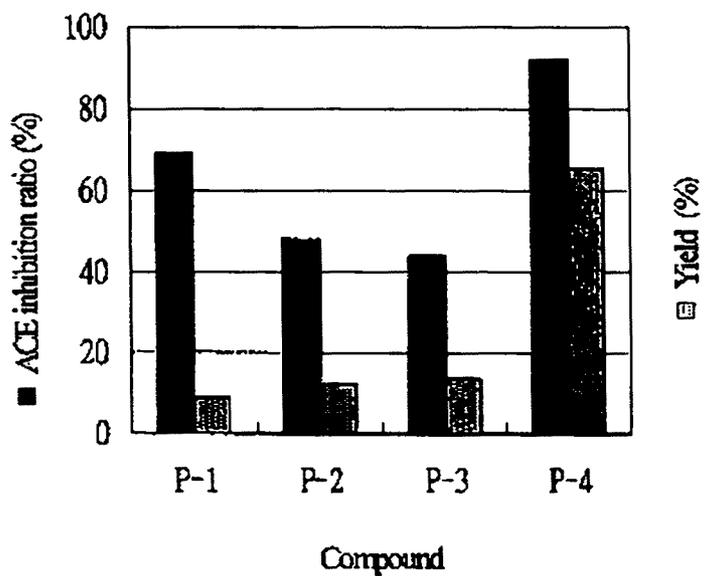


Fig. 15. ACE inhibition ratio and yield of compounds P-1 to P-4 obtained from HPLC

Table 14. Changes in yield and ACE inhibition ratio according to each purification step

Purification step	Yield (%)	Inhibition ratio (%)
60% Acetone	100.00	52.32
n-Butanol	24.09	62.48
AMB ^{a)}	3.28	74.92
SIL ^{b)}	1.48	80.72
SEP ^{c)}	0.08	82.74
HPLC ^{d)}	0.04	92.00

a) Amberlite XAD-2 column chromatography

b) Silicagel G 60 column chromatography

c) Sephadex LH-20 column chromatography

d) High performance liquid chromatography

4) ACE 저해물질의 질량 및 구조 분석

(1) UV spectrophotometer 측정

들미나리의 ACE 저해물질로 추정되는 화합물 P-4를 Fig. 16과 같이 preparative HPLC로 순수분리한 다음 이를 분취, 농축하여 분말을 얻고 이 분말을 소량의 물에 녹여 UV absorption scanning을 실시한 결과는 Fig. 17과 같이 259.8nm에서 최대흡광도를 나타내어, 이 물질은 방향족 ring을 가진 화합물로 추정되었다.

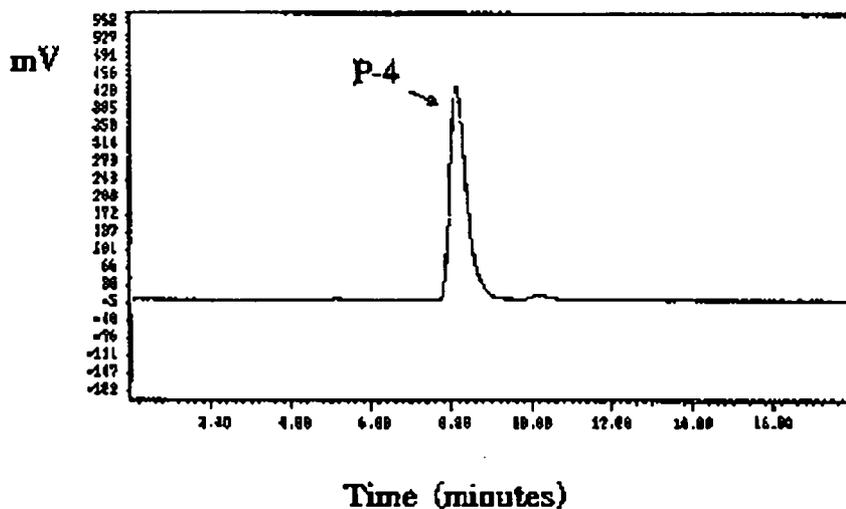


Fig. 16 Preparative HPLC chromatogram of the finally purified active principle (compound P-4 obtained from HPLC)

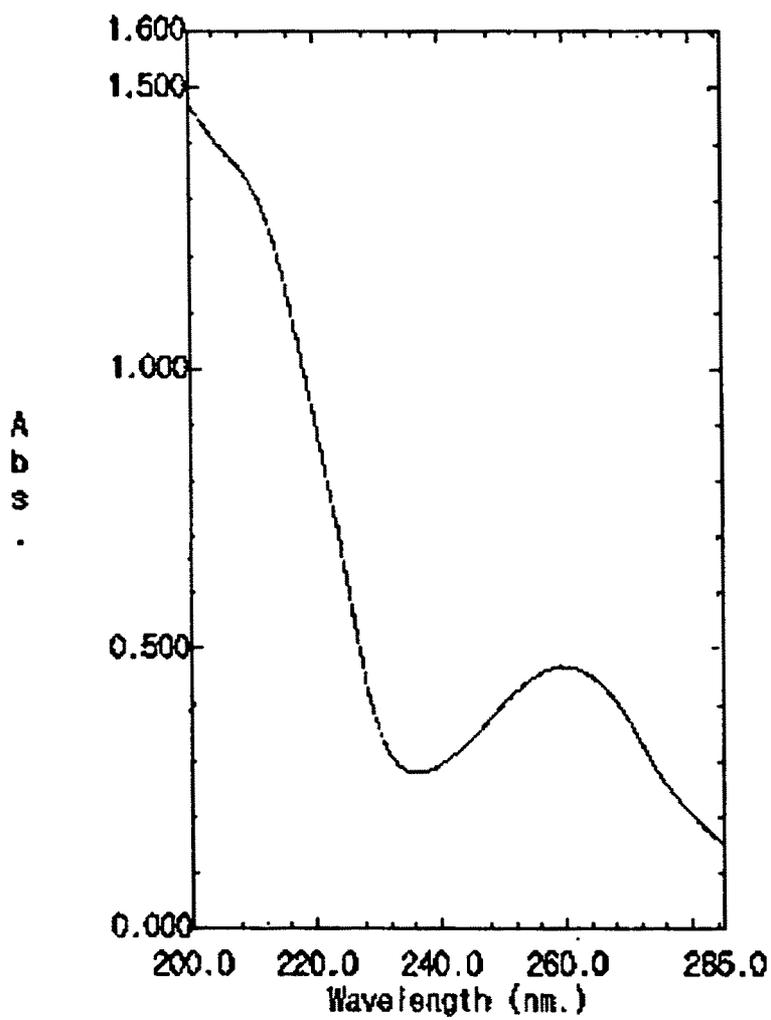


Fig. 17. UV spectral data of compound P-4

(2) FAB-MS 측정

화합물 P-4의 분자량을 확인하기 위하여 positive ion FAB-MS를 측정하였을 때 Fig. 18에서 나타나는 바와 같이 MW 267(관측치 m/z : 268[M+H])인 것으로 확인되었다.

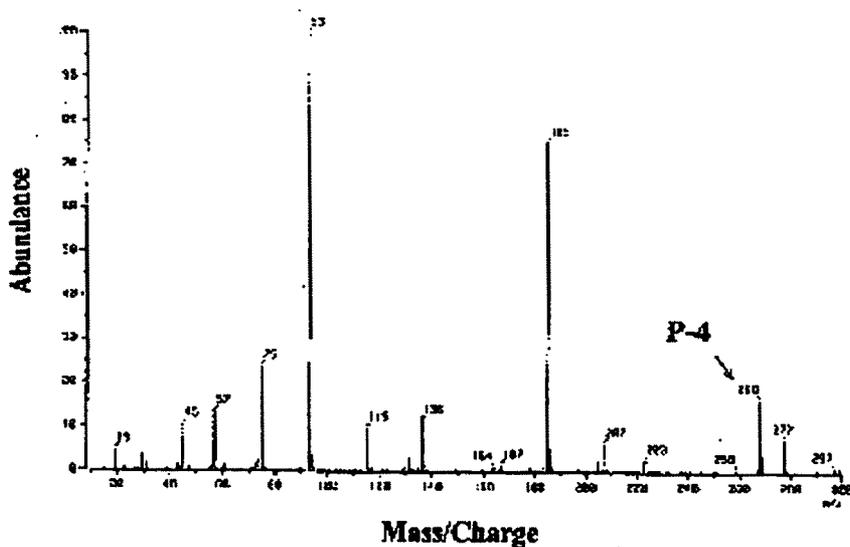


Fig. 18 FAB-MS spectrum of compound P-4

(3) ^1H 및 ^{13}C -NMR spectrometry에 의한 구조해석

ACE 저해물질인 화합물 P-4의 ^1H 및 ^{13}C -NMR spectral data는 Table 15와 같다

Table 15. ^1H 및 ^{13}C -NMR spectral data of compound P-4

No.	$^1\text{H}^*$			$^{13}\text{C}^{**}$	
	δ (ppm)		Integra.	J (Hz)	δ (ppm)
2	8.33	s	1H		139.9 d
5	8.12	s	1H		152.4 d
7					156.1 s
8					119.3 s
9					149.1 s
-NH ₂	7.30	s	2H		
1'	5.87	d	1H	6.2	87.9 d
2'	4.59	dd	1H	6.0, 5.2	73.5 d
3'	4.14	dd	1H	4.9, 3.1	70.6 d
4'	3.95	dd	1H	6.7, 3.5	85.9 d
5'	3.66	dd	1H	12.1, 3.7	61.7 t
	3.55	dd	1H	12.1, 3.7	

* 500MHz in DMSO-*d*₆

* 125MHz in DMSO-*d*₆

$^1\text{H-NMR}$ spectrum(Fig. 19)상에서 $\delta 3.55\text{ppm} \sim \delta 5.87\text{ppm}$ 에 나타난 6개의 proton signal은 이 화합물이 배당체임을 시사한다.

또한 $\delta 8.12\text{ppm}(1\text{H}, \text{S})$ 및 $\delta 8.33\text{ppm}(1\text{H}, \text{S})$ 의 signal은 방향환의 존재를 나타냈으며, 이들이 주위의 proton과는 전혀 coupling 하고 있지 않았으므로 ortho, meta 위치의 proton들은 치환된 것으로 확인되었다.

한편, $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (Fig. 20)상에서 $\delta 119.3\text{ppm} \sim \delta 156.1\text{ppm}$ 에 나타난 signal은 방향환중에 모두 5개의 탄소가 존재하며, $\delta 61.7\text{ppm} \sim \delta 87.9\text{ppm}$ 에 나타난 sugar moiety의 signal이 5개인 것으로 미루어 이 화합물은 furanoside인 것으로 추정되었다. 그리고 DEPT(45°)spectrum을 측정한 결과, $\delta 119.3\text{ppm} \sim \delta 149.1\text{ppm}$ 및 $\delta 156.1\text{ppm}$ 등 3개의 signal이 반전 되었으므로 이들 탄소는 완전히 치환된 것으로 확인되었다.

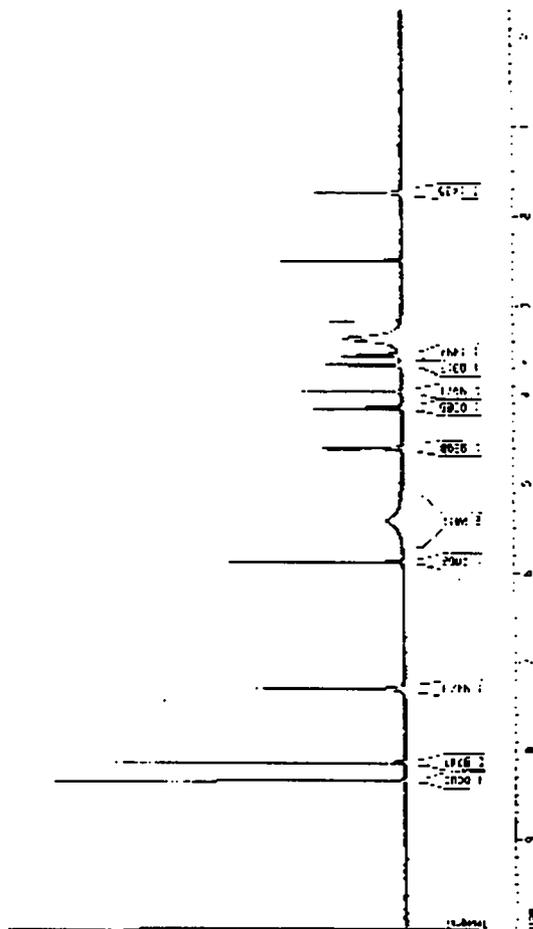


Fig. 19. $^1\text{H-NMR}$ spectrum* of compound P-4

* The spectrum was measured in $\text{DMSO-}d_6$ at 125MHz

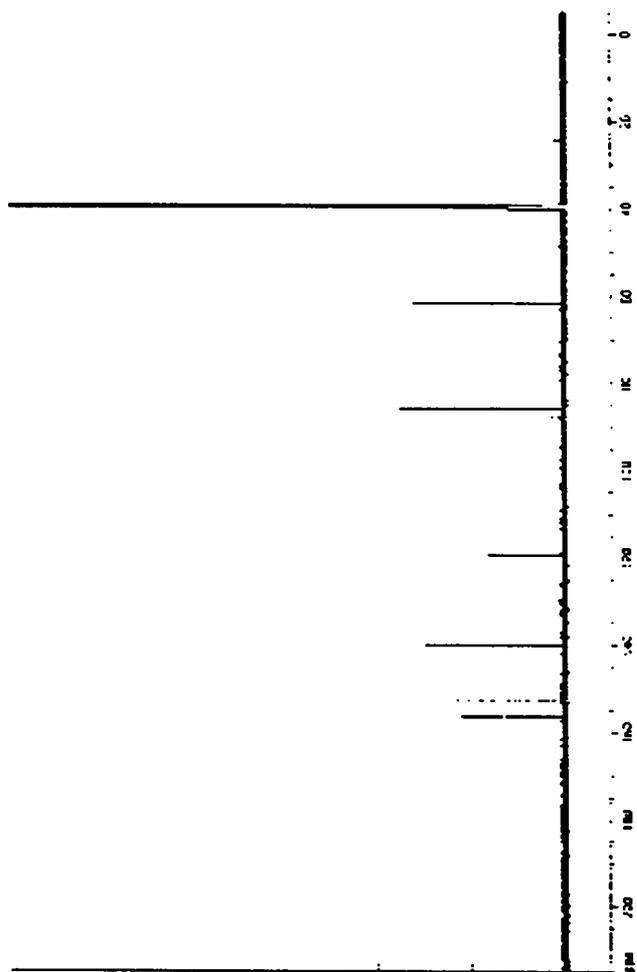


Fig. 20. ^{13}C -NMR spectrum* of compound P-4

* The spectrum was measured in $\text{DMSO}-d_6$ at 500MHz

이 화합물은 HMQC spectrum 상에서 (Fig. 21) 8번 탄소(δ 139.9ppm)와 4번탄소(δ 152.4ppm)에 각각 δ 8.33ppm(1H, S) 및 δ 8.12ppm(2H, S) signal과 상관관계에 있어 이들이 서로 결합하고 있으며 또한 δ 7.30ppm(2H, S)의 signal은 어떤탄소와도 상관관계를 보이지 않아 -NH₂기의 존재가 강력히 시사되었다. 따라서 -NH₂의 결합 위치를 확인하기 위하여 HMBC spectrum을 측정된 결과는 Fig. 22에 나타난 바와 같이 6번 탄소와 -NH₂기가 강한 상관관계를 나타내었으므로 이들이 서로 결합하고 있는 것으로 확인되었다.

위와같은 구조 분석 결과와 함께 FAB-MS측정으로 얻어진 분자량이 267인 것을 감안하면 이 물질은 ribonucleoside의 일종인 6-amino-9- β -D-ribofuranosyl-9H-purine 즉 adenosine인 것으로 최종 동정되었으며 그 화학구조는 Fig. 23와 같다.

순수정제한 P-4는 adenosine의 표준품과 TLC상에서의 R_f치, 및 HPLC상에서 R_f치가 완전히 일치하였을 뿐만 아니라 동일한 UV scanning pattern을 나타내었다.

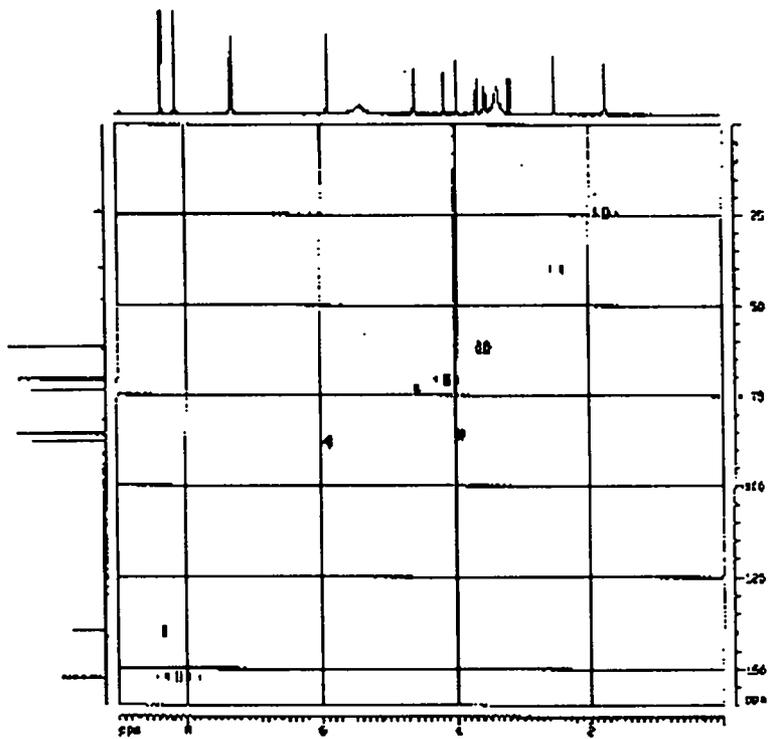


Fig. 21. HMQC spectrum of compound P-4

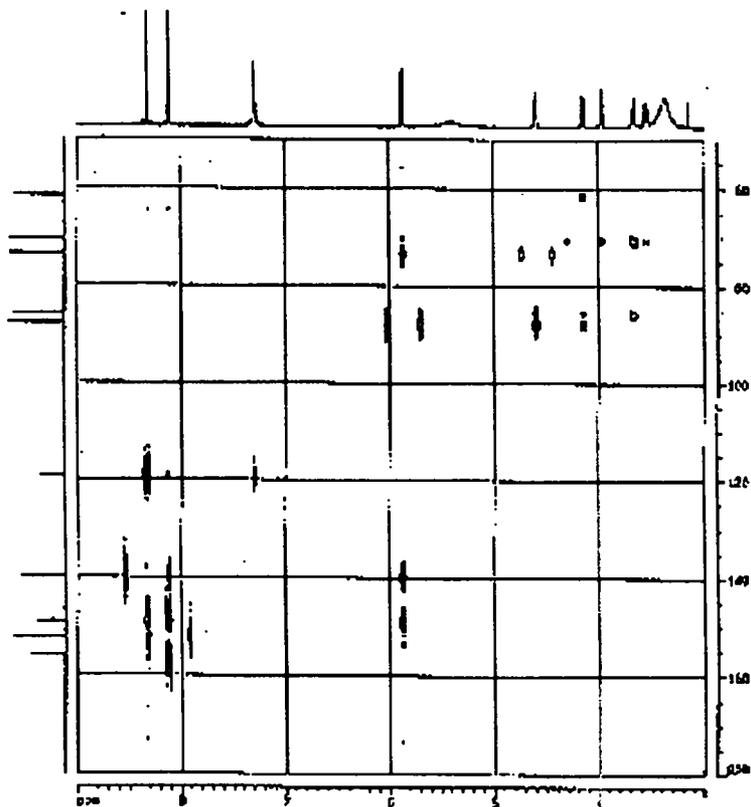


Fig. 22. HMBC spectrum of compound P-4

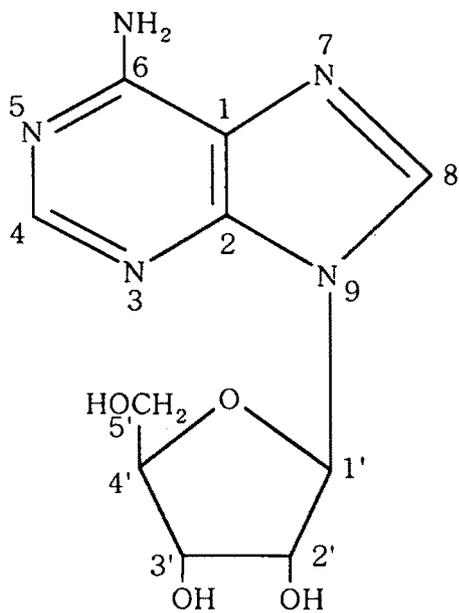


Fig. 23. Structure of compound P-4 (Adenosine)

5. 팔의 ACE 저해물질 분석

탈지 팔 분말시료를 사용하여 물과 유기용매로 추출하여 ACE저해활성을 측정하고, 분리단백질을 제조하여 효소별 단백질 가수분해물의 ACE 저해활성을 측정하고, ACE 저해활성이 높은 pepsin 처리 단백질 가수분해물을 사용하여 각 중 column chromatography, HPLC를 실시하여 ACE 저해 peptide를 분리 정제하고 그 peptide의 아미노산 조성과 아미노산 서열을 측정하였다.

1) 물 및 유기용매 추출물의 ACE 저해활성

물 및 유기용매 추출물의 ACE 저해활성을 측정한 결과는 Table. 16과 같다. 유기용매 별로는 ethanol에서 가장 높았고, 그다음 methanol>chloroform>ethylether>ethylacetate 순으로 나타났고 불용성추출물에서는 ACE 저해활성이 거의 나타나지 않았다.

물 추출물은 유기용매추출물에 비하여 ACE 저해활성이 현저히 높아 ACE 저해활성 성분은 물에 추출되어 나오는 수용성물질임을 알 수 있었다.

도 등⁽⁴⁷⁾에 의하면 들깨, 오미자, 오갈피 및 생강에서도 유기용매추출시 보다는 물 추출시에 그리고 유기용매 추출시에는 불용성 보다는 가용성획분에서 ACE 저해효과가 더 크게 나타난다고 하여 본 실험 결과와 같은 경향이였다.

2) 단백질 가수분해물의 ACE 저해효과

효소 종류에 따라 단백질 가수분해물의 ACE 저해효과를 측정하였을 때(Table 17) 최적 가수분해 시간은 8시간이었으며, 효소별로는 pepsin에 의한 가수분해물에서 ACE 저해효과가 가장 높았다. 그 다음 alcalase>bromelain>papain> α -chymotrypsin 등의 순으로 높게 나타났고 pancreatin과 trypsin에서는 낮게 나타났다.

Table. 16 ACE inhibitory activity and yield of various solvent extracts from small red bean

Solvent	Inhibitory activity(%)	Yield(%)
Water	62.0	17.2
MeOH	38.7 (soluble)	12.5
	0 (insoluble)	5.4
EtOH	51.8 (soluble)	14.8
	0.8 (insoluble)	6.3
Ethylacetate	6.2 (soluble)	11.5
	0 (insoluble)	4.8
Chloroform	28.0 (soluble)	9.4
	0 (insoluble)	5.5
Ethylether	8.2 (soluble)	13.7
	4.1 (insoluble)	7.1

Table 17. ACE inhibitory activity of small red bean protein hydrolysates by treatment with various enzymes for 8 hours

Enzyme	Inhibitory activity (%)
Pepsin	83.27
Trypsin	15.66
α -chymotrypsin	30.6
Alcalase	65.12
Bromelain	61.56
Papain	37.9
Pancreatin	21.88

3) 단계별 column chromatography를 통해 분리된 유효성분 분획물의 ACE 저해 효과

(1) Ion exchange column chromatography에 의한 분리

팔단백질 가수분해물을 YM-10 membrane을 사용하여 ultrafiltration하여 얻은 분자량 10,000이하의 저분자물질을 SP-Sephadex C-25-column chromatography을 행하였다. 여기서 분획되어 나온 fraction의 ACE 저해 활성을 측정한 결과는 Fig 24와 같이 1.0M ammonium formate 용액으로 용출시켰을 때 ACE 저해활성이 가장 높은 peak 1과 peak 2를 얻었고, 0.5M ammonium formate 용액으로 용출시켰을 때 peak 3을 얻었다. 증류수로 용출시킨 비흡착 획분에서도 ACE 저해활성을 나타내지 않았다.

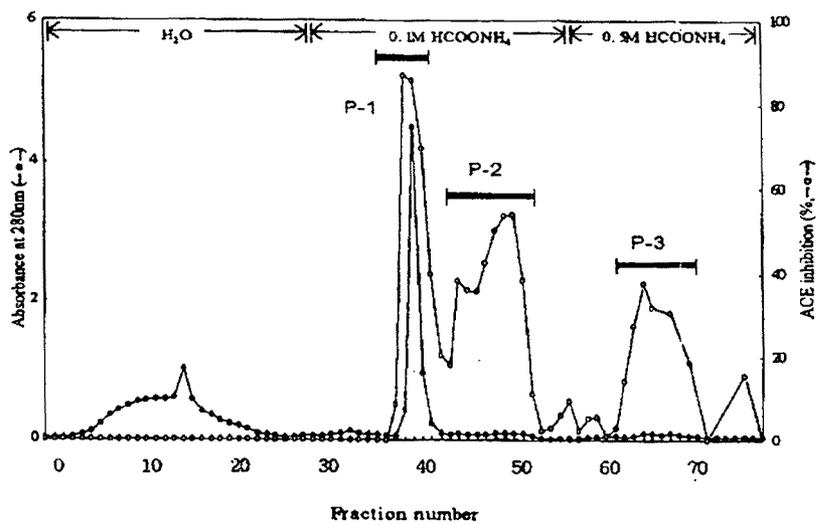


Fig 24. Chromatography on SP Sephadex C-25 column of filtrate from YM-10 membrane

A stepwise gradient elution (condition): 200ml of H₂O. 400ml of 0.1M ammonium formate (pH 6.05), 400ml of 0.5M ammonium formate (pH 6.05)

Maruyama 등¹⁵⁾은 casein의 효소가수분해물의 SP Sephadex C-25 column chromatography를 행한 결과 0.2M ammonium formate로 용출시킨 획분에서 높은 ACE 저해 활성을 나타낸다고 하여 본 실험 결과와 비슷한 경향이였다.

(2) ODS column chromatography 에 의한 분리

SP Sephadex C-25 column chromatography에서 얻은 P-1, P-2 및 P-3을 각각 감압 농축하여 증류수에 일정량이 되도록 녹인 다음, 증류수로 평형시킨 후 전 단계에서 함께 용출된 염을 제거할 목적으로 OSD column chromatography를 행한 결과는 Table 18과 같다.

여기서 보면 ACE 저해효과를 갖는 peptide는 20% EtOH 용액으로 용출시킨 획분 (Y-2)부터 60% EtOH 용액으로 용출시킨 획분(Y-4)의 범위까지 용출되어 나옴을 볼 수 있었고, 그 중 P-1과 P-3은 20%-40% 범위의 EtOH에서 P-2는 20%-60% 범위의 EtOH 농도에서 가장 높은 ACE 저해 활성 물질이 용출되어 나왔다. 그러나 ACE 저해 활성이 높은 Y-1 획분은 다량의 염이 함께 석출되었기 때문에 시료로 사용하지 않았다.

**Table 18. ACE inhibitory activity of fraction on ODS
column chromatography**

Fraction No.	Inhibitory activity (%)		
	P-1*	P-2	P-3
Y-1	91.11	75.35	98.32
Y-2	95.99	97.28	86.345
Y-3	89.74	97.82	96.47
Y-4	53.69	90.61	55.24
Y-5	0	0	0

Each fraction eluted with 200ml of 0%, 20%, 40%, 60% and 100%-ethanol solution is denoted as Y-1, Y-2, Y-3, Y-4 and Y-5, respectively.

*P-1, P-2 and P-3 fractions were obtained from SP Sephadex C-25 column chromatography

Ukeda 등⁵³⁾은 정어리 단백질가수분해물에서의 ODS column chromatography를 행하였을 때 10%-25% 범위의 EtOH농도에서 용출시킨 획분에서 ACE 저해활성이 나타났고, 특히 25%의 EtOH 용액에서 가장 높은 ACE 저해 활성물질이 용출된다고 하여 본 실험 결과와 유사하였다. 또한 Matsui 등²³⁾은 19%-50%범위의 EtOH 용액으로 용출시킨 획분에 ACE 저해 활성이 나타났고, 그 중 10% EtOH용액에서 높다고 보고하였다.

ODS column chromatography는 reverse phase chromatography system으로서 용질의 소수성에 친화력을 갖고 있어서 흡착력은 분자내의 탄소수의 증가와 비례하므로 높은 농도의 EtOH 용액에서 용출되는 ACE 저해 활성물질은 소수성 아미노산 함량이 많은 peptide 라고 추정된다⁵³⁾.

(3) Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 분리

위의 ODS column chromatography에서 얻은 ACE 저해활성획분을 모두 모아서 감압 농축한 후 10% methanol 로 평형시키고 Sephadex LH-20 column chromatography를 행한 결과는 Fig 25와 같다.

여기서 보면, ACE 저해 활성 peak와 단백질 peak가 완전히 일치하지 않는 것으로 보아 ACE 저해활성물질이 단백질 이외에 분자량이 작은 여러 가지 peptide가 혼합되어 있음을 알 수 있었다.

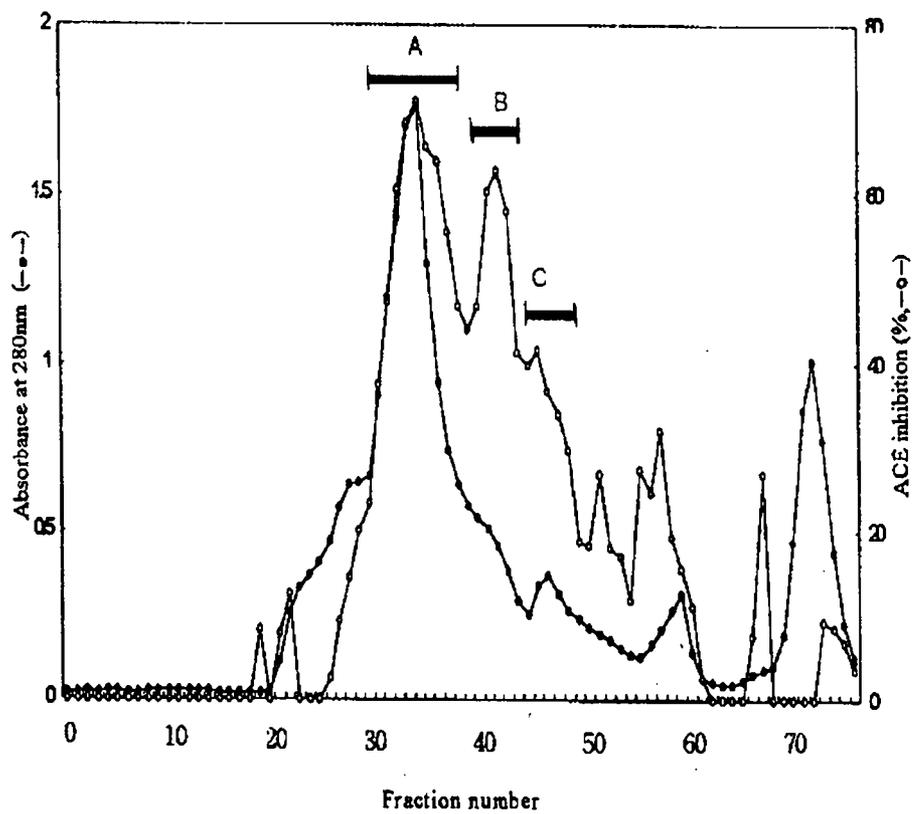


Fig 25. Chromatography of Sephadex LH-2 column of ACE inhibitors eluted with 20%-60% ethanol from ODS column chromatography

(4) High performance liquid chromatography에 의한 분리

앞의 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 얻어진 ACE 저해 활성이 가장 높은 peak A를 취하여 감압농축한 후 $0.4\mu\text{m}$ pore size의 HPLC prefilter로 걸러서 불순물을 제거시킨 후 Capcell pak C₁₈ UG120을 이용하여 HPLC를 행한 결과는 Fig 26과 같다.

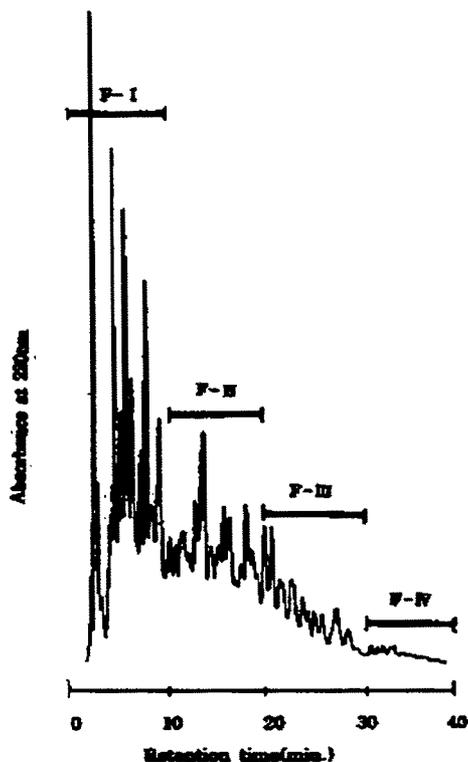


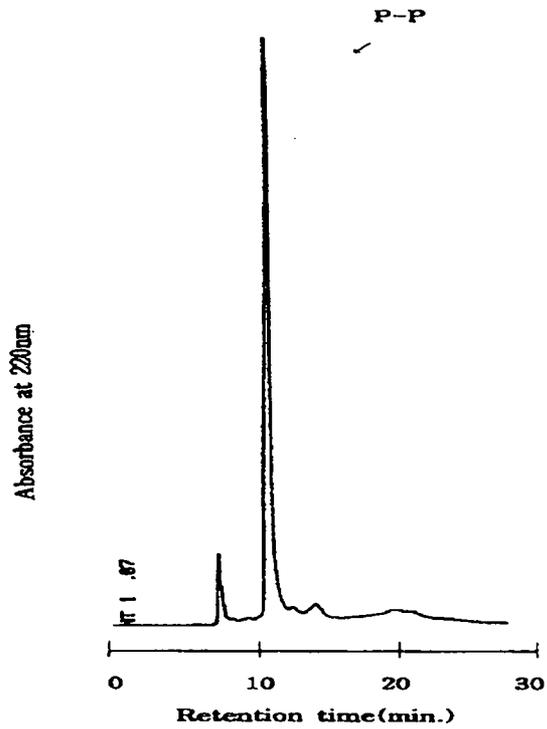
Fig 26. HPLC chromatogram of peak A obtained from Sephadex LH-20 column chromatography

Conditions for HPLC : column, Capcell pak C-18(1.0×25cm), mobile phase, CH₃CN(5%-40% for 40min), flow rate, 3.0ml/min

여기서 보면 많은 단백질 peak가 나타났으며, 이들을 retention time에 따라 10분씩 4개의 획분 (F- I, II, III, IV)으로 나누어 분취하고, 이중 ACE 저해활성이 가장 높은 2번째 획분 (Fraction II)을 모아 (Table 19), 감압농축 시킨후, rechromatography를 실시하여 단일 peptide peak를 얻어 (Fig.27) 아미노산조성 및 아미노산서열 측정용 시료로 사용하였다.

Table 19. ACE inhibitory activity and protein contents of fraction - I, - II, - III, and -IV on HPLC

Fraction	Inhibition activity (%)	protein contents ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
I	76.08	32.15
II	88.59	38.07
III	84.20	43.95
IV	28.48	62.51



**Fig. 27. HPLC chromatogram of ACE inhibitors fraction
(Fraction II) obtained from HPLC**

✓P-P ; peptide peak exhibiting ACE inhibitory activity

4) 팔의 ACE 저해 peptide의 동정

HPLC에서 분리한 ACE저해 활성이 높은 단일 peptide peak의 아미노산 함량을 분석한 결과 (Table 20) Asp의 함량이 62.95nm/ml로서 가장 많았고 그 다음 Leu>Val>Glu>Gly>Ile>Pro의 순으로 함유되었고, Cys과 His은 적은량으로 함유되어 있었다. 그리고 HPLC에서 분리한 ACE저해 peptide는 Fig 28에서와 같이 N말단으로부터 5개 잔기까지의 아미노산 배열(amino acid sequence)이 F-V-L-G-P-(Phe-Val-Leu-Gly-Pro-)의 순으로 나타났다.

Table 20. Amino acid composition of ACE inhibitory peptide from small red bean protein hydrolysates

Amino acid	Concentration(nmol/ml)	Composition (%)
Asp*	62.95	11.92
Glu**	46.20	8.75
Ser	33.57	6.35
Gly	38.49	7.29
His	8.09	1.53
Arg	19.10	3.62
Thr	24.41	4.62
Ala	26.30	4.98
Pro	32.58	6.17
Tyr	14.75	2.79
Val	50.78	9.61
Met	12.58	2.38
Cys	5.81	1.10
Ile	37.36	7.07
Leu	60.13	11.38
Phe	32.26	6.11
Lys	22.89	4.33
Total	528.25	100.0

* Amount of aspartic acid containing asparagine

** Amount of glutamic acid containing glutamine

염 등²⁶⁾은 고등어 근육단백질 가수분해물에서 ACE 저해peptide는 Asp, Glu, Lys, Leu, Val 및 Ala의 함량이 많은 것으로 보고하였다.

신 등³⁸⁾은 된장으로부터 분리한 ACE 저해활성이 가장 높은 fraction의 아미노산 분석에서 총 아미노산조성 중 His과 Phe이 많은 부분을 차지하였고, 그외에 Asp, Glu, Ser, Gly, Arg, Thr, Val, Ile, Lys 등이 소량 함유된다고 하였다.

Cushman 등¹²⁾은 여러 가지 dipeptide를 합성하여 ACE저해효과를 나타내는 C-말단 아미노산잔기로서는 Try, Tyr, Pro 혹은 Phe 이 그리고 N-말단 아미노산잔기로서는 branched-chain aliphatic amino acid가 경쟁적 저해제로서 ACE에 결합하는 peptide로서 적당하다고 하였다. 그리고 Cheung 등⁵⁰⁾은 peptide의 C 말단내에 있는 아미노산 중 glutamyl-L-proline과 succinyl-L-proline이 ACE의 가장 좋은 binding 위치에 있음을 보고하였다.

Kohmura 등¹⁹⁾은 C 말단에 proline을 갖고 있는 합성한 peptide 들의 ACE저해효과를 확인하여 N-말단의 peptide종류에 의해서도 ACE저해활성이 달라진다고 하였다.

Maruyama 등²²⁾은 합성한 peptide중에서 V-H-L-P-P의 배열의 peptide가 ACE저해활성을 보인다고 하였고, Kohmura 등¹⁷⁾은 V-R-P 배열의 peptide가 ACE 저해활성을 보인다고 하였다.

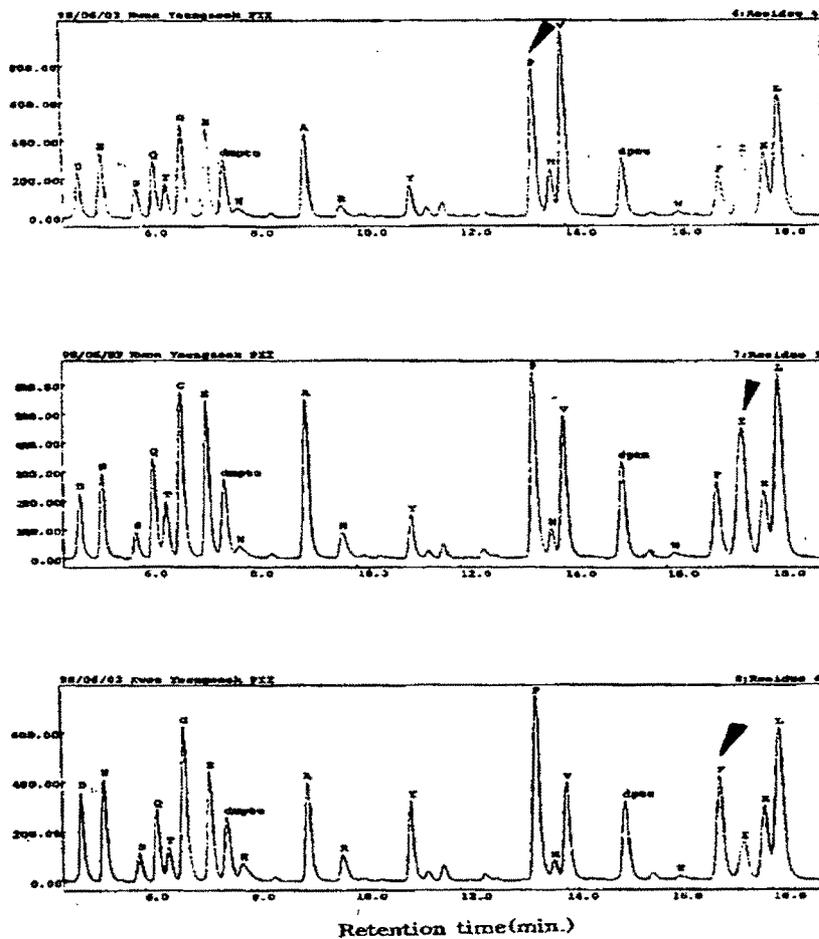
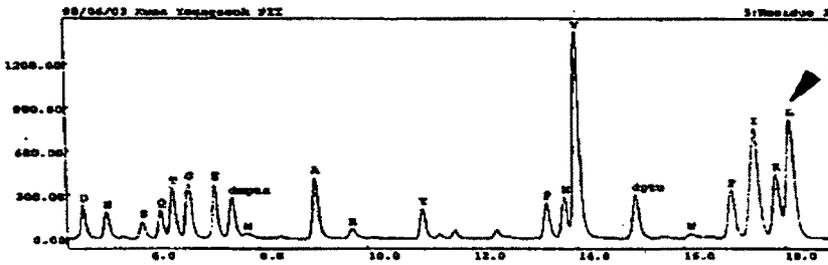
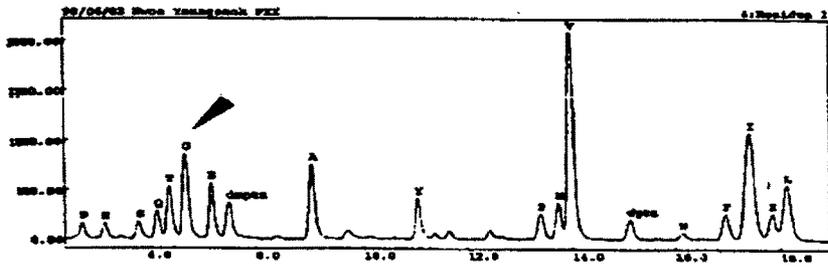
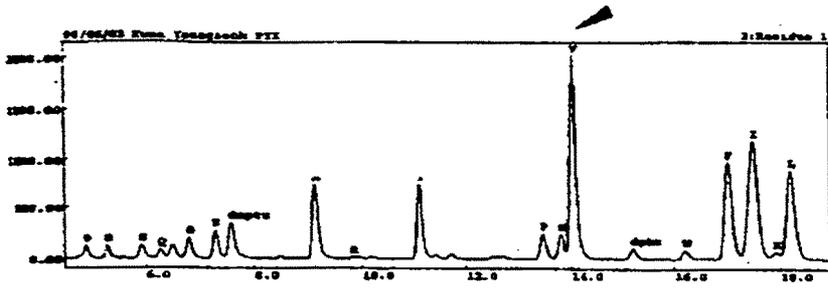


Fig. 28 Chromatogram of purified ACE inhibitors peptide obtained from protein sequencer (ABI 473A)

continued



Retention time(min.)

6. 강낭콩의 ACE 저해물질 분석

1) 물 및 유기용매 추출물의 ACE 저해효과

탈지강낭콩분말을 물로 추출하여 얻은 물추출물과 유기용매(methanol, ethanol, ethylacetate, chloroform, diethylether)로 추출하여 얻은 가용성 추출물과 불용성 추출물에 대하여 ACE 저해활성 및 수율을 측정한 결과는 Table 21과 같다. 그 결과를 보면 물추출시 ACE 저해활성이 50.9%로 가장 높았으며, 유기용매 별로는 diethylether에서 44.06%로 가장 높았고, 그 다음으로는 methanol > ethanol > ethylacetate > chloroform > 60% acetone 의 순으로 나타났으며 이들 모든 용매에서는 가용성 추출물에서 높은 ACE 활성을 보이고 불용성에서는 활성이 거의 나타나지 않았다.

또한 추출물의 수율을 고려할 때에도 물추출물이 더 효율적임을 알 수 있다. 그리고 물추출물은 유기용매추출물에 비해 ACE 저해효과가 현저하게 높아 ACE 저해성분이 수용성 물질임을 알 수 있었다.

2) 단백질 가수분해에 따른 ACE 저해효과

(1) 단백질 가수분해물의 peptide-nitrogen 함량

시료단백질에 증류수를 가하여 현탁한 뒤 효소에 따라 pH와 온도를 달리 하면서 pepsin, trypsin, α -chymotrypsin, alcalase, bromelain, papain 및 pancreatin을 각각 제품 증량을 기준으로 1% 농도가 되게 첨가하고 가수분해 시키면서 시간에 따른 peptide-nitrogen의 생성량을 측정한 결과는 Fig 29와 같이 가수분해 8시간까지는 급격히 증가하였으나 그 이후에는 경미한 증가 또는 감소하는 경향이였다. 8시간을 기준으로 볼 때 pepsin 처리시 peptide-nitrogen 생성량이 가장 많았고 bromelain>pancreatin>papain>trypsin의 순으로 나타났다.

Table 21. ACE inhibitory activity and yield of water and various solvent extracts from kidney bean.

(%)

Solvent	Inhibitory activity(A)	Yield (B)	(A) × (B)/100
Water	51.0	19.1	9.74
Methanol	43.5 ^a	2.4	1.04
	4.14 ^b	71.8	
Ethanol	37.5 ^a	1.1	0.40
	5.4 ^b	82.9	
Ehylacetate	29.9 ^a	0.2	0.05
	1.0 ^b	85.5	
Chloroform	28.5 ^a	0.1	0.03
	4.2 ^b	78.5	
Diethylether	44.1 ^a	0.2	0.09
	0 ^b	79.9	
60% Acetone	12.9 ^a	6.6	0.85
	0 ^b	76.3	

^a soluble about organic solvent

^b insoluble about organic solvent

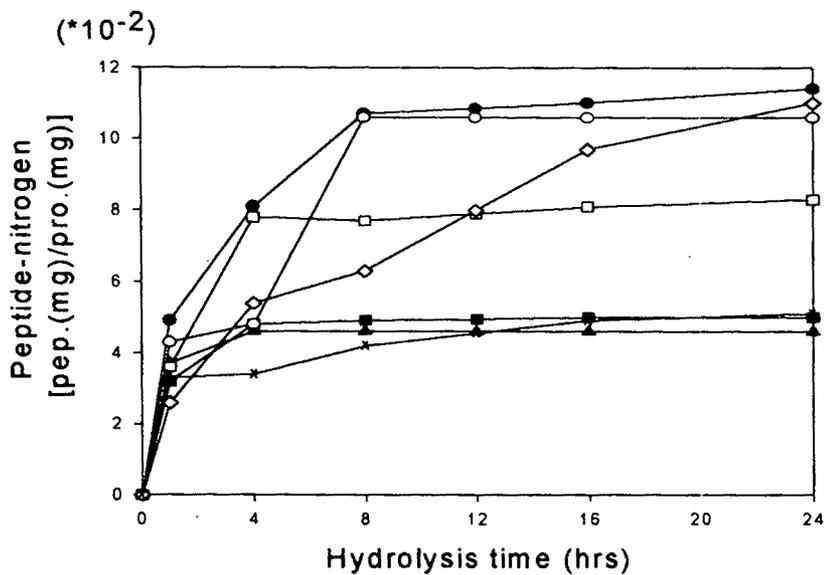


Fig 29. The changes in peptide-nitrogen content of defatted kidney bean protein hydrolysate by various proteases during hydrolysis time.

- : pepsin (600unit/mg)
- ▲-▲ : trypsin (0.6unit/mg)
- : α -chymotrypsin (38unit/mg)
- : alcalase (1.94×10^4 unit/mg solid)
- △-△ : bromlain (2unit/mg)
- : papain (2.1unit/mg)
- ◆-◆ : pancreatin (52unit/mg)

(2) 단백질 가수분해물의 ACE 저해효과

효소종류에 따른 단백질 가수분해물의 ACE 저해활성을 보면 Table 22와 같다.

Table 22. ACE inhibitory activity of defatted kidney bean protein hydrolysate by proteases

Enzyme	ACE inhibition (%)				
	1h	4h	8h	16h	24h
Pepsin	59.30	69.50	72.42	75.06	77.70
Trypsin	2.65	3.41	20.81	21.67	22.52
α -Chymotrypsin	17.20	35.76	33.26	32.59	31.82
Bromelain	46.52	40.45	34.29	34.18	34.06
Pancreatin	1.44	10.25	24.77	18.17	11.56
Papain	42.00	47.44	64.39	56.61	48.83
Alcalase	15.74	43.59	55.22	47.92	40.62

여기서 보면 가수분해 8시간에 가장 높게 나타났으며 그 이후에도 감소 또는 큰 변화를 보이지 않았다. 효소별 또는 8시간 가수분해에서 pepsin처리시 가장 높았고 그 다음 papain > alcalase > bromelain > α -chymotrypsin 등의 순으로 높게 나타났다. 그리고 pepsin으로 8시간 가수분해 시켰을 때 peptide-nitrogen 생성량과 ACE 저해활성이 높게 나타나 peptide 함량과 ACE 저해효과사이에는 밀접한 상관관계가 있는 것으로서 이의 ACE 저해물질은 단백질가수분해물인 peptide일 것이라는 추측을 가능케 한다. 또 어떤 효소는 24시간 가수분해에서 ACE 저해활성이 감소됨을 보였는데 이는 peptide 의 가수분해가 더 진행됨에 따라 peptide의 길이나 구조가 달라진 때문이라 여겨지고 시료의 종류에 따라 가수분해에 의하여 생성된 peptide의 사슬 길이와 배열이 다르기 때문일 것이라고 사료된다.

염 도⁴⁸⁾ 대두단백질의 가수분해 시간에 따른 ACE 저해작용은 8시간까지는 급격히 증가하는 경향은 나타내었으나 그 후로는 완만하게 증가하거나 또는 감소되고 하여 본 시료와 같은 경향을 보였다.

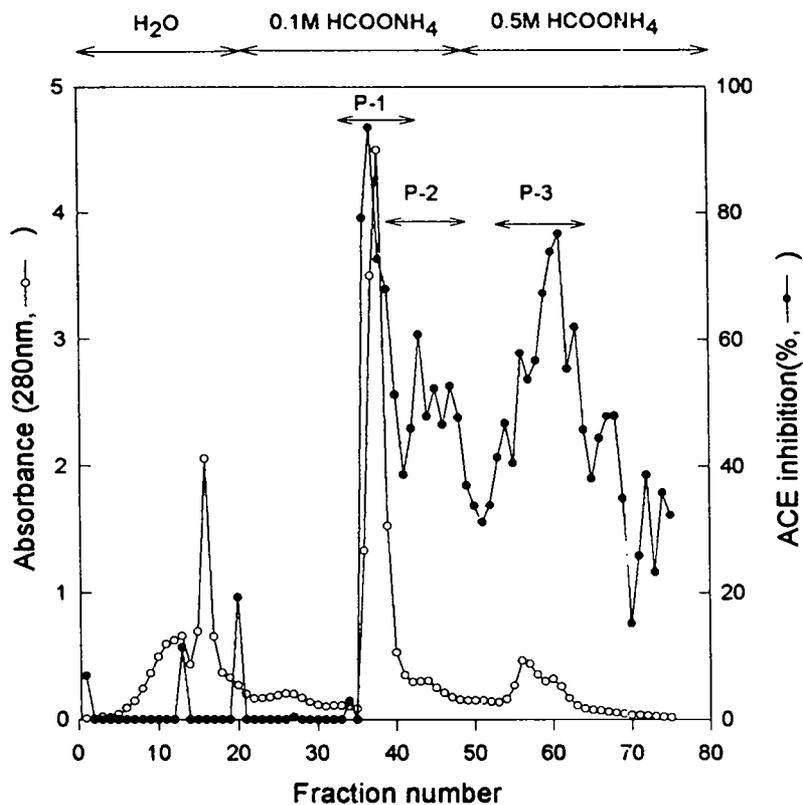
3) 단계별 column chromatography를 통해 분리된 유효성분 분획물의 ACE 저해효과

(1) Ion exchange column chromatography에 의한 분리

강낭콩 단백질 가수분해물을 YM-10 membrane을 사용하여 ultrafiltration하여 얻은 분자량 10,000 이하의 저분자 물질을 Sp Sephadex C-25-column chromatography을 행하였다. 여기서 분획하여 나온 fraction의 ACE 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 30과 같다.

0.1M ammonium formate 용액로 용출시켰을 때 ACE 저해활성이 가장 높은 peak 1과 peak 2를 얻었고, 0.5M ammonium formate 용액로 용출시켰을 때 peak 3을 얻었다. 증류수로 용출시킨 비흡착 획분에서는 저해활성을 나타내지 않았다.

Marayama 등⁵⁴⁾은 무화과나무 유액은 Sephadex C-25-column chromatography 한 결과 0.5M ammonium formate 용액으로 용출시킨 획분에서 더 높은 ACE 저해활성은 보인다고 하였다. 또한 casein 가수분해물의 Sp Sephadex C-25 column chromatography에서는 0.2M ammonium formate 용출획분에서 높은 ACE 저해활성을 나타낸다고 하여¹⁵⁾, 본 실험결과와 비슷한 경향을 보였다.



**Fig. 30. Chromatography and ACE inhibitory activity of fraction on Sp
Sephadex C-25-column of filtration from YM-10 membrane.**

* A stepwise gradient elution(condition) : 250ml of H₂O, 450ml of 0.1M ammonium formate (pH 6.20), 450ml of 0.5M ammonium formate (pH 6.20).

(2) ODS column chromatography에 의한 분리

Sp Sephadex C-25-column chromatography에서 얻은 peak 1, 2 및 3을 각각 감압농축하여 일정량의 증류수에 녹여 평형시키고, 전단계에서 함께 용출된 염을 제거할 목적으로 ODS column chromatography를 행한 결과는 Table 23과 같다.

Table 23. ACE inhibition of fractions on ODS column chromatography.

Fraction No.	Inhibition ratio (%)		
	P-1*	P-2	P-3
Y-1	92.30	98.18	97.87
Y-2	95.03	84.94	94.94
Y-3	97.43	99.44	95.00
Y-4	56.94	89.45	84.07
Y-5	18.77	25.98	82.06

Each fraction eluted with 200ml of 0%, 20%, 60% and 100%-ethanol solution is noted as Y-1, Y-2, Y-3, Y-4 and Y-5 respectively.

여기서 보면 Y-1, Y-2 및 Y-3 획분에서 ACE 저해효과가 높게 나타났는데, Y-1 획분은 다량의 염이 함께 석출되기 때문에 시료로 사용하지 않았다.

Ukeda등⁵⁵⁾은 정어리 단백질가수분해물에서의 ODS column chromatography에서 10%~25% ethanol 농도로 용출시킨 획분에서 ACE 저해활성이 나타났고, 그 중 25% ethanol 용액에서 용출시켰을 때 가장 높은 ACE 저해율을 보인다고 하여 본실험결

과와 유사하였다.

ODS column chromatography는 용질의 소수성에 친화력을 갖고 있어서 흡착력은 분자내의 탄소수의 증가와 비례하므로, 높은 농도의 ethanol용액에서 용출되는 ACE 저해물질은 소수성 아미노산 함량이 많은 peptide라고 추정된다⁵³⁾.

(3) Sephadex LH-20 column chromatography에 의한 분리

앞의 ODS column chromatography에서 얻은 ACE 저해활성 획분은 모두 감압농축한 후 10% methanol로 평형시키고 Sephadex LH-20 column chromatography를 행한 결과는 Fig. 31와 같다.

여기서 ACE 저해활성을 보이는 peak A, B 및 C가 분리되었으며 이들을 취하여 각각 감압농축한 후 HPLC의 시료로 사용하였다.

(4) Reverse-phase high performance liquid chromatography에 의한 분리

앞의 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 얻어진 ACE저해활성이 가장 높은 peak A를 취하여 감압농축한 후 0.4 μ m prefilter로 걸러서 불순물을 제거하고, Capcell Pak C₁₈ UG120을 이용하여 HPLC를 행한 결과는 Fig. 32와 같다.

여기서보면, retention time 에 따라 6개의 획분(Fraction a, b, c, d, e, f)으로 나타났고 이들의 ACE 저해율을 측정한 결과는 Table. 24와 같다.

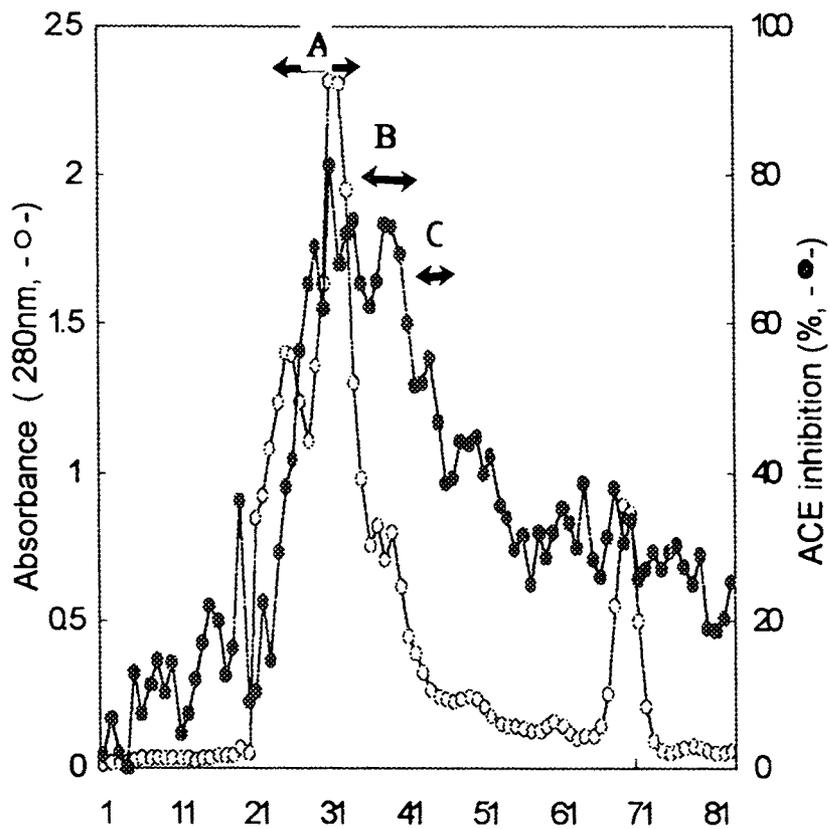


Fig. 31 Chromatography and ACE inhibitory activity of fraction on Sephadex LH-20 column of ACE active fraction eluted with 20~40% ethanol from ODS column chromatography.

Table 24. ACE inhibitory activity and protein contents of fractions on HPLC

Fractions	Inhibitory activity (%)	Protein content($\mu\text{g}/\text{dl}$)
F-a	30.52	22.03
F-b	64.13	14.53
F-c	51.24	21.89
F-d	82.48	36.04
F-e	56.75	28.38
F-f	76.74	139.60

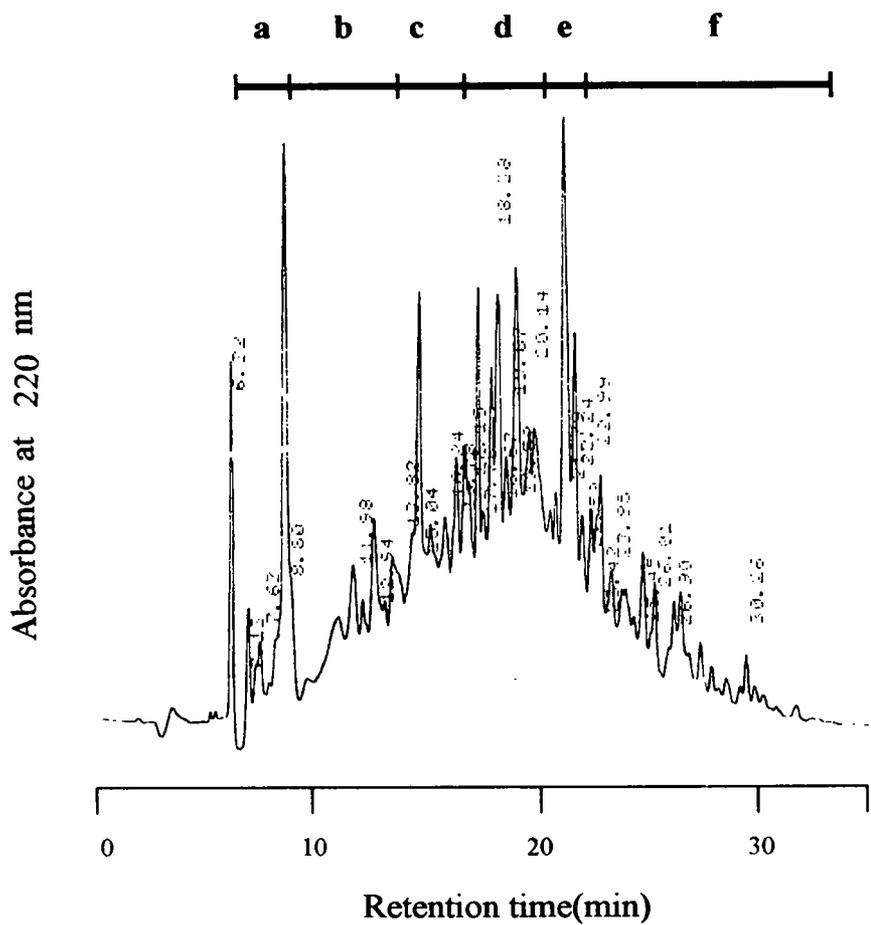


Fig. 32 Reverse-phase HPLC chromatogram of peak obtained from Sephadex LH-20 column chromatography.

Conditions for HPLC: column, Capcell pak C₁₈, mobile phase, CH₃CN(10~45% for 35min) containing 0.08% TFA, flow rate=2.5ml/min.

여기서 보면, 4번째 획분인 Fraction d에서 ACE 저해효과가 가장 높게 나타났으며 이를 획분을 모아 감압농축 시킨 후 rechromatography를 행한 결과는 Fig. 33와 같다. 여기서 다시 6개의 획분(Fraction d_a, d_b, d_c, d_d, d_e, d_f)을 보였고 이중 5번째 획분(Fraction d_e)이 ACE 저해활성이 높게 나타났고, 이를 다시 감압농축한 후 rechromatography를 행하여 3개 획분(Fraction d_e-I, d_e-II, d_e-III)으로 분리하였고 (Fig. 34) 이 중 3번째 획분인 Fraction d_e-III에서 높은 활성을 나타내었다.

마지막으로 ACE 저해활성이 가장 높은 Fraction d_e-III만을 다시 rechromatograph 하여 단일 peptide peak를 얻었으며 (Fig. 35), 이를 Electrospray 와 아미노산 서열측정용 시료로 사용하였다.

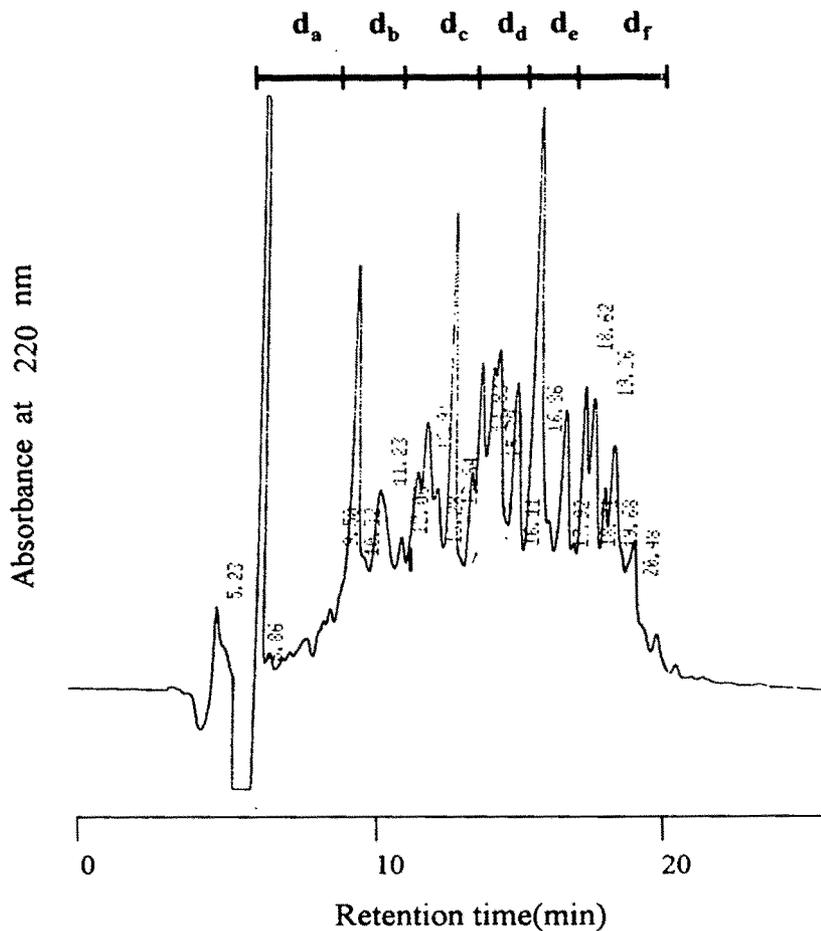


Fig. 33. Reverse-phase HPLC rechromatogram of ACE inhibitors fraction (Fraction d) obtained from HPLC.

Conditions for HPLC: column, Capcell pak C_{18} , mobile phase, $CH_3CN(10\sim 45\%$ for 35min) containing 0.08% TFA, flow rate= $2.5ml/min$.

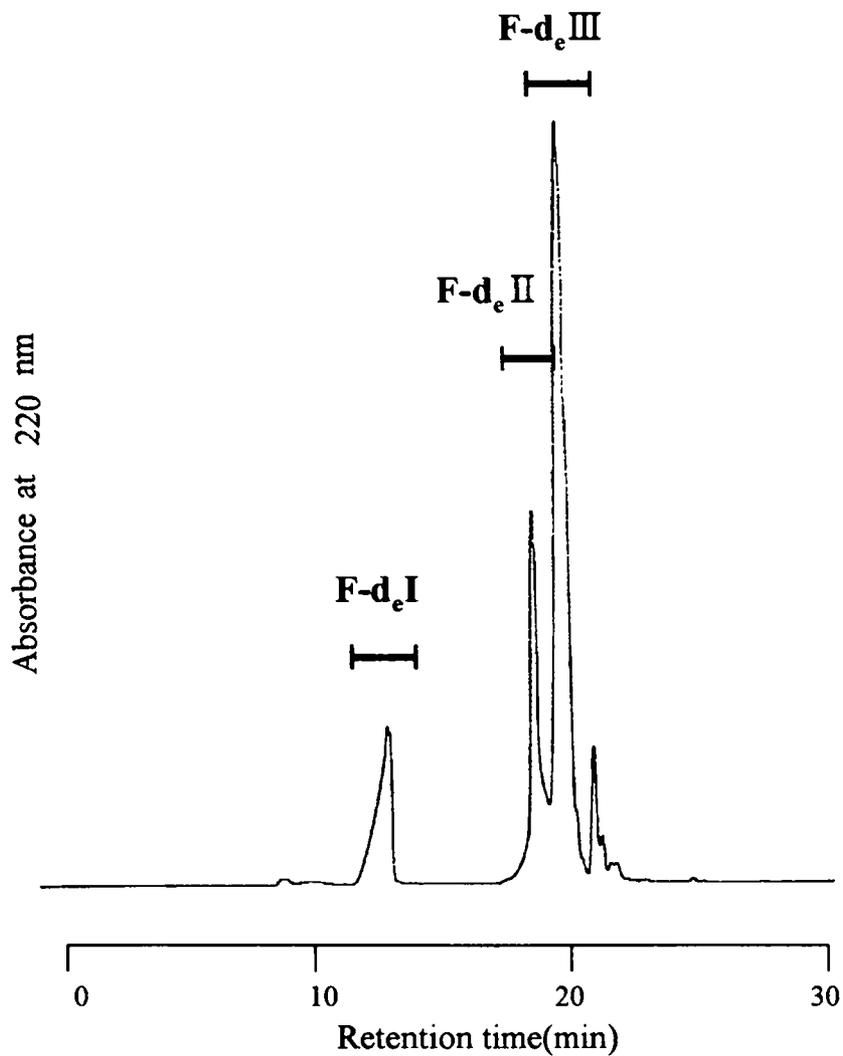


Fig. 34. Reverse-phase HPLC rechromatogram of ACE inhibitors fraction (Fraction d_e) obtained from HPLC.

Conditions for HPLC: column, Capcell pak C₁₈, mobile phase, CH₃CN(20~30% for 28min) containing 0.08% TFA, flow rate=2.5ml/min.

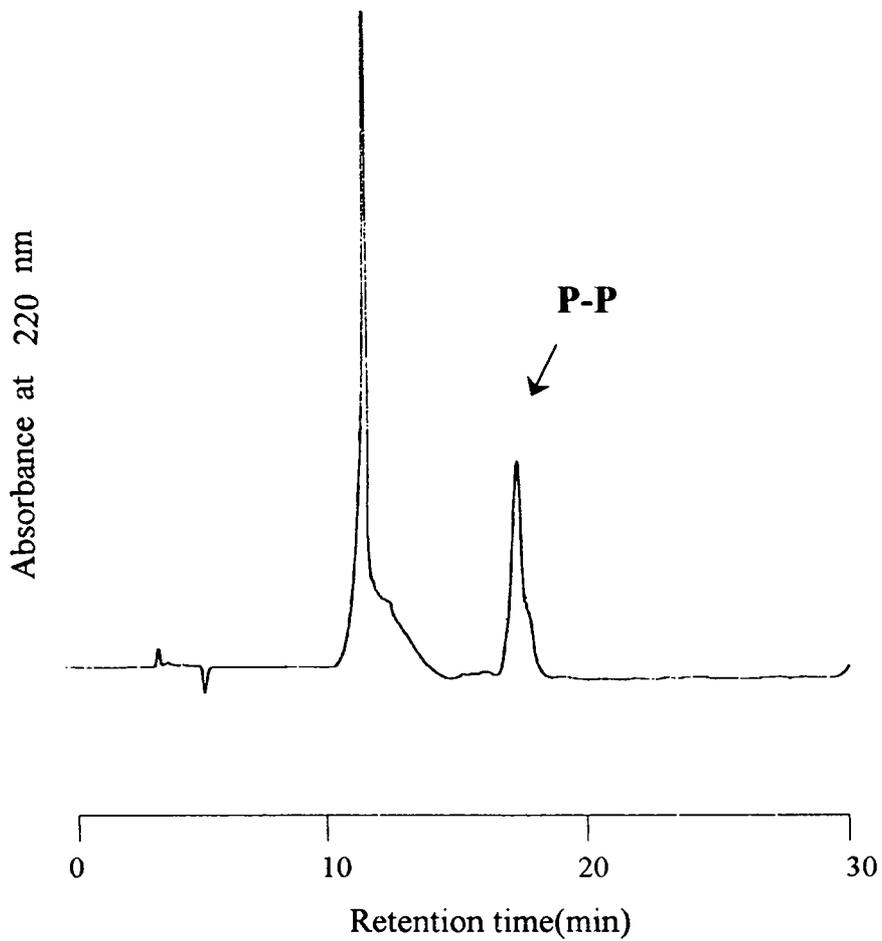


Fig. 35. Reverse-phase HPLC rechromatogram of ACE inhibitors fraction (Fraction d_e-III) obtained from HPLC

P-P : peptide peak exhibiting ACE inhibitory activity

4) ACE 저해물질의 동정

(1) Electrospray-MS 측정

HPLC에서 분리하여 ACE 저해활성이 가장 높았던 단일 peptide peak의 분자량을 확인하기 위하여, Electrospray-Mass Spectrometer를 이용하여 Fig. 36과 같이 측정하였다. 그 결과 M.W. 633.09 dalton인 것으로 확인되었다.

이는 기존의 ACE 저해물질이 대개 전분자로 알려진 것과 동일한 결과이었다.

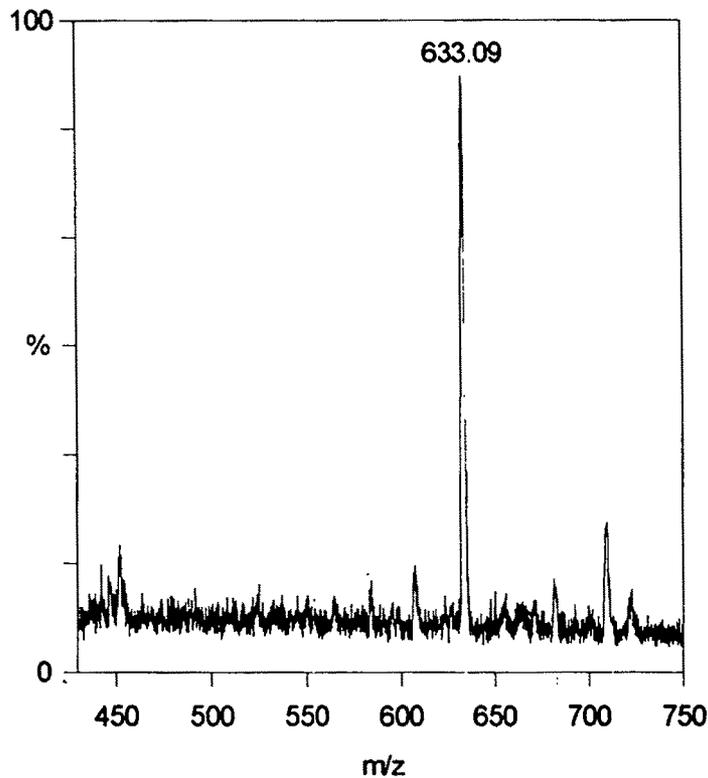


Fig. 36 Electrospray-mass spectrum of Fraction P-P.

(2) Amino acid sequence의 분석

HPLC에서 순수 분리된 단일 peptide는 N-말단으로부터 6개잔기까지의 아미노산 서열(amino acid sequence)인 Val -Ile-Pro-Ala-Tyr의 순으로 나타났다(Fig. 37). 그리고 각각의 아미노산의 분자량의 합이 632.80 daltons으로서 앞의 Electrospray-MS 측정에서 얻은 분자량이 633.09daltons인 것을 감안할 때 동일물질임을 알 수 있었다.

Cushman 등¹¹⁾은 여러 가지 dipeptide를 합성하여 ACE 저해효과를 나타내는 C-말단 아미노산잔기로서 Trp., Tyr., Pro., 혹은 Phe. 과 같은 소수성 아미노산으로 끝나고 N-말단아미노산잔기로서는 branched-chain aliphatic amino acid가 경쟁적 저해제로서 ACE에 결합하는 peptide로 적당하다고 하였다. 그리고 Cheung 등⁵⁰⁾은 peptide의 C-말단에있는 아미노산 중 ghatamyl-L-proline과 succinyl-L-proline이 ACE의 가장 좋은 binding 위치에 있음을 보고하였다. 염 등²⁶⁾은 고등어 근육단백질 가수분해물에서 ACE 저해 peptide는 Asp., Glu., Lys., Leu., Val. 및 Ala. 의 함량이 높다고 하였다.

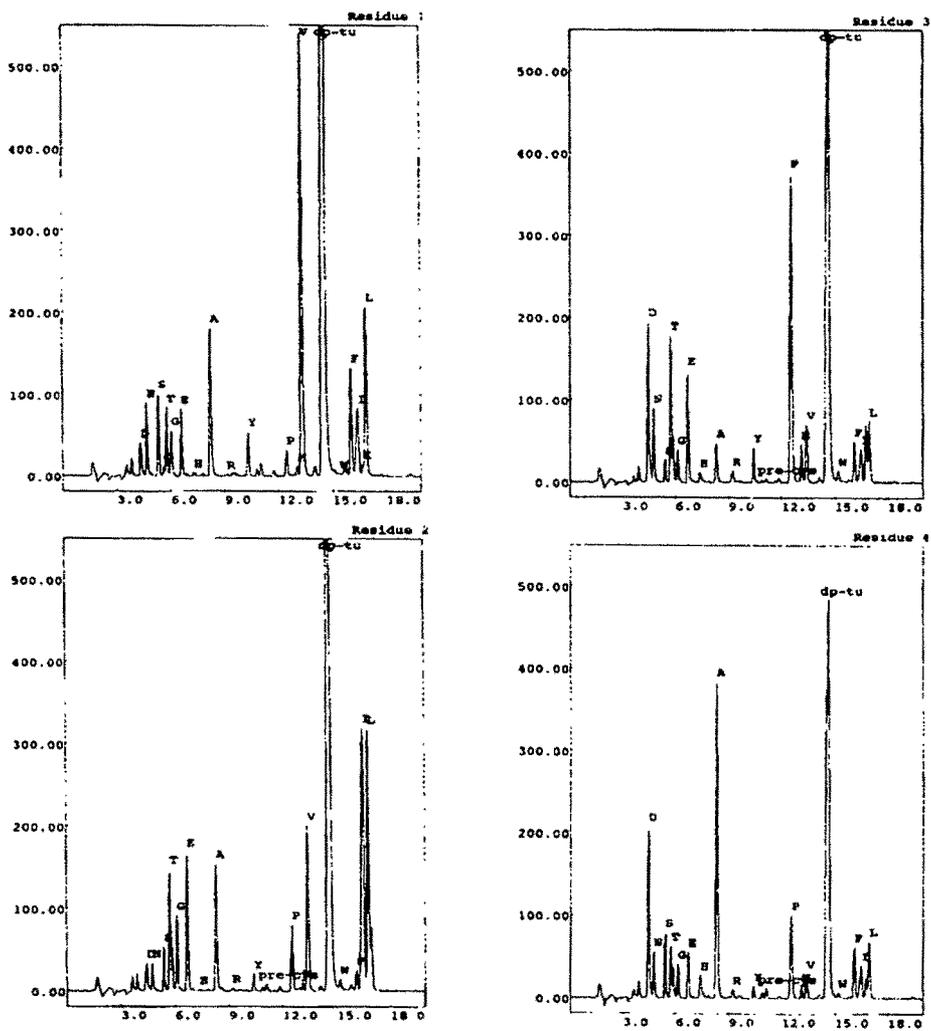
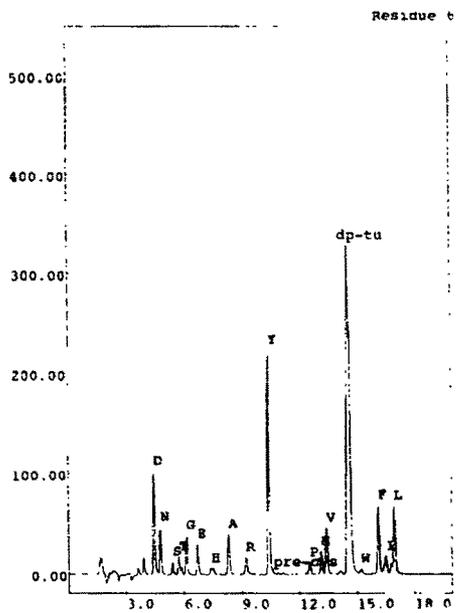
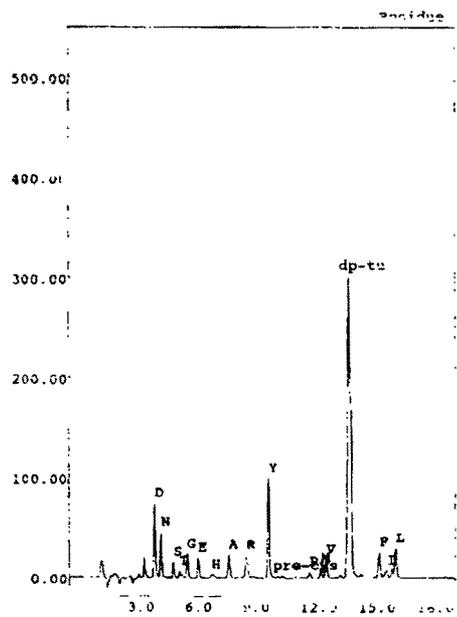
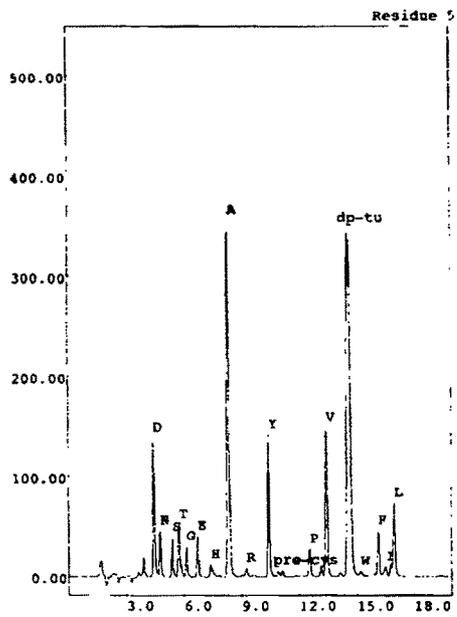


Fig. 37 Chromatogram of purified ACE inhibitory peptide
 obtained from protein sequencer. (continued)



7. 브로콜리의 ACE 저해물질 분석

채소류 중 ACE 저해활성이 높은 브로콜리 (*Brassica oleracea*)의 성분을 분석하고 저 물과 용매로 추출하고 각종 chromatography, TLC 및 HPLC를 실시하여 ACE 저해물질을 분리, 정제하였다.

1) 용매별 분획

브로콜리의 50% acetone 추출물을 water, ethylacetate, 및 *n*-butanol로 분획하여 ACE 저해활성과 수율을 측정한 결과는 Table 25 와 같다.

Table 25. ACE inhibition ratio and yield of 50% acetone, water, ethylacetate and *n*-butanol extracts* of *Brassica oleracea*

Solvents	Inhibition ratio (%)	Yield (%)
50% acetone	59.73	28
Water	72.46	14
Ethylacetate	-	7
<i>n</i> -Butanol	-	5

*: each sample amount used in ACE inhibitory experiment = 250 μ g/250 μ l

브로콜리의 50% acetone 추출물의 ACE 저해활성은 59.73% 였으며 이의 용매별 분석에서는 물층에서만 72.46%로 높게 나타났고, 수율도 높아 대부분의 활성이 물층에 존재하는 것으로 확인되었다. 이는 앞의 돌미나리에서의 ACE 저해활성이 *n*-Butanol 획득분에 존재하는 결과와는 다르게 나타났다.

2) 단계별 column chromatography 를 통해 분리된 유효성분 획득분의 ACE 저해효과

대량으로 조제한 브로콜리의 water fraction을 사용하여 Amberlite XAD-4 column chromatography를 행하였다.

여기서 얻어진 water, 30%-, 50%-, 70%- 및 100%-methanol fraction 에 대해 ACE 저해활성을 측정한다. 결과로 Fig. 38과 같이 50%-, 70%-, 및 100% methanol fraction 에서 각각 84.37, 82.77, 및 81.22%의 높은 활성을 나타내었다. 그리고 수율면에서는 물층이 32.6%로 가장 높았으나 ACE 저해활성이 낮아서 이용성이 적을 것으로 사료되었다.

저해활성이 확인된 50%-, 70%- 및 100% methanol fraction의 혼합농축물에 대해 Sephadex LH-20 column chromatography 과정을 통하여 Fig. 39와 같이 4개의 획득분 A, B, C, 및 D를 얻었다.

이들에 대한 ACE 저해효과는 획득분 A가 82.5%, B가 57.9%로 높은 저해효과를 보이였으며, 이중 획득분 A의 경우에는 67.5%의 높은 수율을 나타내었다. ACE 저해효과가 높은 획득분 A와 B를 혼합하여 감압 농축한 분획물을 대상으로 Sephadex LH-20을 이용한 rechromatography 를 행하여 Fig. 40과 같이 세 개의 획득분 I, II, III을 얻었으며 이들에 대한 ACE 저해효과를 측정한 결과 획득분 I이 81.5%로 가장 높게 나타났다.

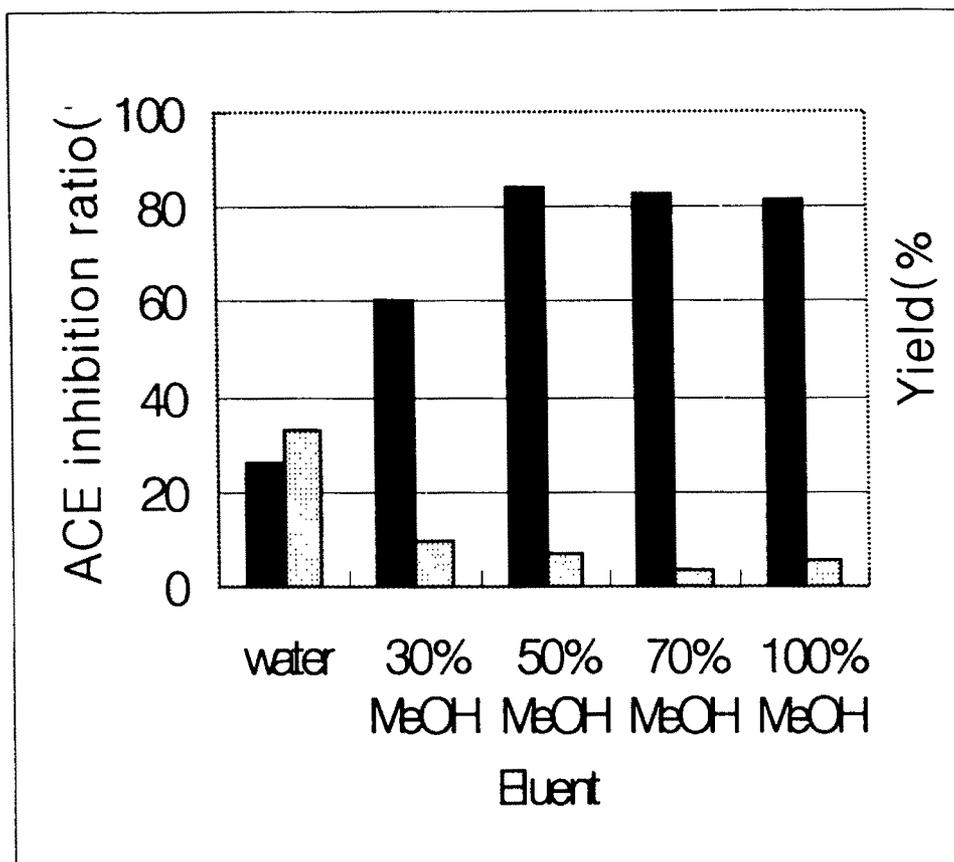


Fig. 38. ACE inhibition ratio and yield of eluents after washing amberlite XAD-4 resin with water, 30%, 50%, 70% and 100% MeOH

: ACE inhibition ratio (%)
 : Yield (%)

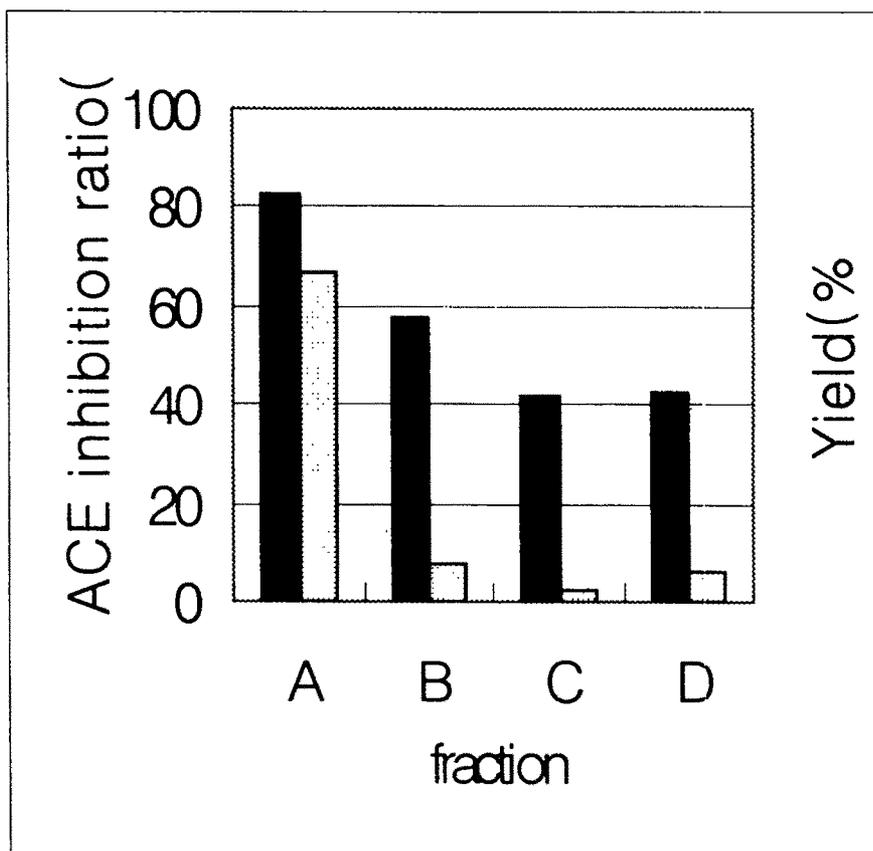


Fig. 39. ACE inhibition ratio and yield of fraction A, B, C and D after sephadex LH-20 column chromatography

: ACE inhibition ratio (%)
 : Yield (%)

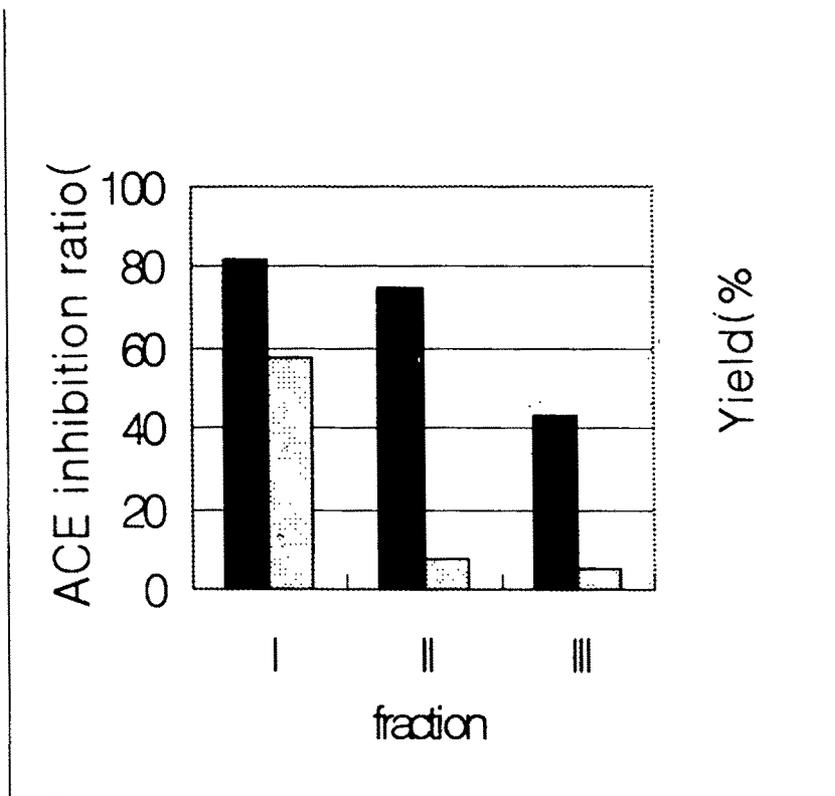


Fig. 40. ACE inhibition ratio and yield of fraction I, II, III after sephadex LH-20 column rechromatography

■ : ACE inhibition ratio (%)
 ▨ : Yield (%)

Sephadex LH-20 column rechromatography에서 얻은 획분 I로부터 ACE 활성을 저해하는 유효성분의 순수분리를 위하여 HPLC를 수행하였다(Fig. 41). 여기서 나타난 6개의 획분(P-1 ~ P-6)을 분취, 이를 농축하여 ACE 저해활성을 측정한 결과(Fig. 42), P-2가 94%로 가장 강한 저해활성을 보였고, 수율도 45.5%로 높게 나타났고, P-3 또한 90.6%로 높은 활성을 보였다. 이상의 결과 정제단계가 진행할수록 ACE 저해물질의 수율은 급격히 감소하나 순도가 높아져 저해효과가 증가함을 알 수 있다. (Table 26)

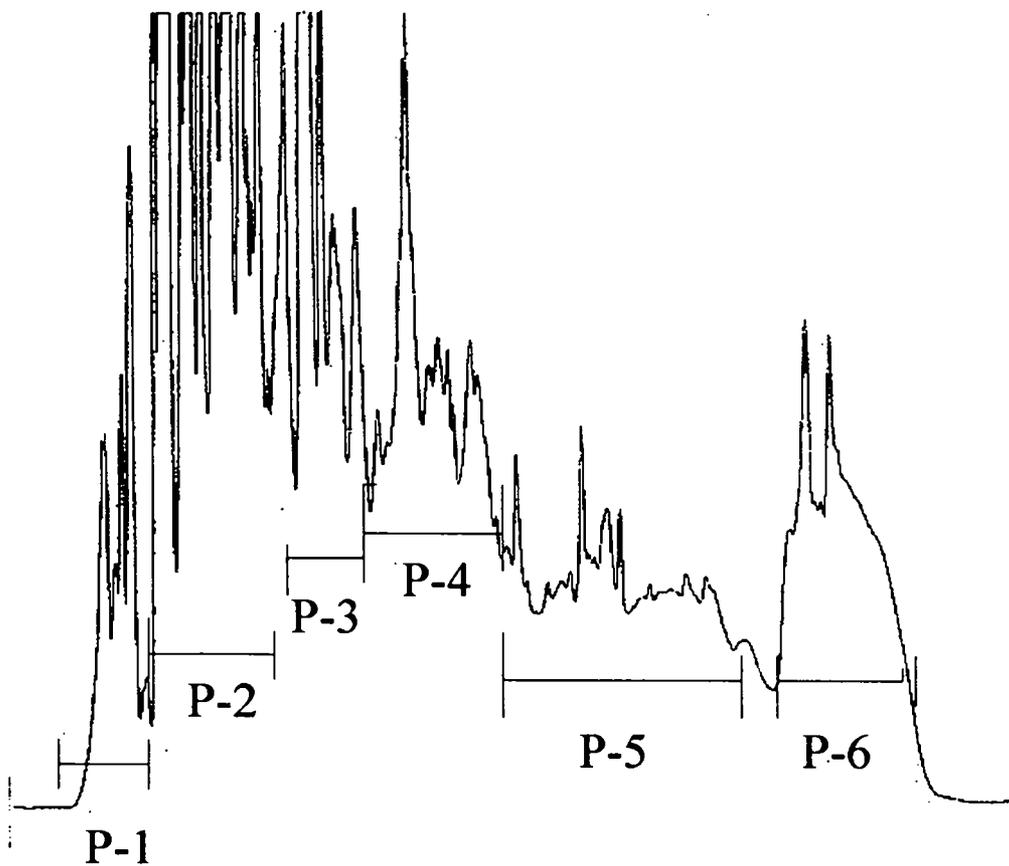


Fig. 41. HPLC chromatogram of fraction I obtained from sephadex LH-20 column rechromatography(absorbance at 214nm)

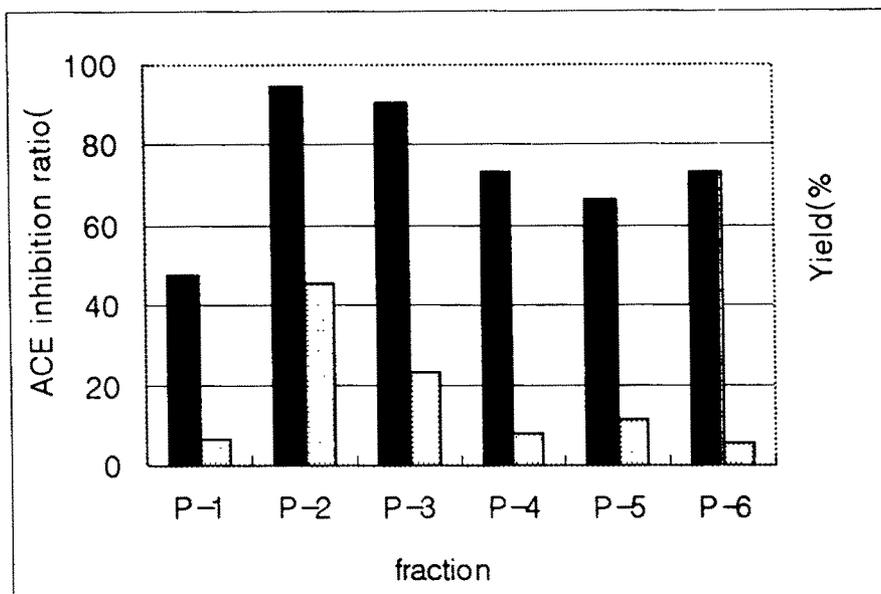


Fig. 42. ACE inhibition ratio and yield of compounds P-1~P-6 after the isolation by HPLC

: ACE inhibition ratio(%)
 : Yield(%)

Table 26. Change in yield and ACE inhibition ratio according to each purification step

Purification step	Yield(%)	Inhibition ratio(%)
50% Acetone	100.00%	59.73%
Water	50.00%	72.46%
AMB ^{a)}	16.30%	82.98%
SEP ^{b)}	12.06%	82.50%
SEP ^{c)}	1.10%	81.50%
HPLC ^{d)}	0.5%	94.00%

a) Amberlite XAD-4 column chromatography

b) Sephadex LH-20 column chromatography

c) Sephadex LH-20 column rechromatography

d) High performance liquid chromatography

제 4 절 : 결 론

본 연구는 한국산 곡류, 서류, 두류, 과실류, 채소류, 어패류 및 전통차 음료 등 총 110여종의 식품소재를 선정하여 물 및 유기용매로 추출하여 ACE 저해활성을 측정하였고, 그 중에서 일부는 투석 및 가열에 따른 ACE 저해효과의 변화를 측정 비교하였다. 그리고 이들 식품소재 중 ACE 저해활성이 높은 재료, 즉 채소류, 두류, 패류 등에서 5종을 선정하여 물 또는 유기용매로 추출하고 농축시킨 다음 용매별 획분화를 통하여 유효성분을 추출하든지 또는 효소처리한 단백질 가수분해물을 얻어서 유효성분을 추출하여 이들을 Amberlite XAD-2, Silica gel G 60, Bio-gel p-2, Sephadex LH-20, Sephadex C-25 column chromatography 등으로 gel filtration 하여 ACE 저해활성 성분을 분리 해내고 HPLC를 이용하여 정제시켜 얻은 ACE 저해 peptide물질은 아미노산분석과 protein sequencer를 사용하여 물질동정을 하든지, 또는 비 peptide성 물질은 UV Spectrophotometer, Mass 등을 이용하여 ACE 저해물질의 구조 분석을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

물추출에 따른 ACE 저해효과를 보면 채소류에서는 돌나물, 돌미나리, 마늘, 부추, 브로콜리, 파슬리에서 70% 이상의 높은 ACE 저해율을 보이었고, 수율에서는 호박, 마늘, 돌나물, 양파, 브로콜리, 시금치, 오이, 파, 배추, 부추의 순으로 20% 이상 나타났고, 시료별 수율에 따른 저해율을 보면 마늘, 브로콜리, 돌나물, 부추, 돌미나리, 파의 순으로 높았다.

차류에서는 홍차와 커피에서 50% 이상 높게 나타났다. 곡류에서는 메밀, 귀리가, 두류에서는 팥, 동부, 강낭콩, 대두가, 과일류에서는 머루, 파인애플, 키위가, 그리고 어패류에서는 소라, 바지락, 모시조개에서 ACE 저해율이 높게 나타났다.

용매추출에서는 물 추출시보다 전반적으로 ACE 저해효과가 현저하게 낮았으며, 용매별로 보면 팥은 ethanol, ethylether 추출물에서, 동부는 ethylether 추출물에서, 그리고 강낭콩은 ethylether, methanol 및 ethanol 추출물에서 높게 나타났으며, 용

때 추출 획분별로는 불용성 추출물보다 가용성 추출물에서 ACE 저해효과가 현저히 높게 나타났다.

투석물에서는 내액보다는 외액의 저분자물질에서 ACE 저해효과가 높게 나타났다.

소라단백질을 효소별로 가수분해하였을 때는 alcalase로 8시간 가수분해에서 peptide-nitrogen 생성량과 ACE 저해활성이 가장 높았다. gel filtration 하여 얻은 소라단백질 가수분해물의 획분별 ACE 저해효과는 Fraction No. 70-80의 범위에서 높게 나타났으며, 이들 획분을 TLC로 확인하고 HPLC로 정제하여 얻은 단일성분의 peptide는 분자량이 약 1,355인 저분자 peptide로서 그 아미노산조성은 phenylalanine, valine, 및 proline 의 순으로 함유되어 있었다.

둘미나리를 60% acetone으로 추출하고 용매별 분획 하였을 때, *n*-butanol 층에서 가장 높은 ACE 저해활성을 보였다. 이 *n*-butanol 층을 Amberlite XAD-2 column chromatography 하였을 때 50% methanol과 100% methanol fraction에서 각각 73.05%와 74.92%의 높은 활성을 보였다. 이를 다시 Silicagel g-60 column chromatography 하였을 때 A, B 및 C 획분을 얻었고, 이중 B와 C 획분에서 80.72%와 70.42%의 강한 활성을 보이며 이 두 혼합액을 sephadex LH-20 column chromatography을 행하여 5개 획분 I, II, III, IV 및 V를 얻었고 이중 획분 III에서 82.74%의 높은 ACE 활성을 보였다. 이 획분 III을 HPLC을 행하여 4개의 main peak (p-1, p-2, p-3 및 p-4)를 분취하였을 때 p-4가 92.0%의 높은 활성을 보였다. 이 p-4 획분을 UV absorption scanning 하였을 때 259.8 nm에서 최대 흡광도를 나타낸 방향족 ring을 가진 화합물로 추정되었다. 이 획분을 FAB-MS를 측정하여 분자량 267로 확인하고 ¹H 및 ¹³C-NMR spectrometry에 의하여 구조분석하여 furanoside로 추정하고 DEPT spectrum, HMQC spectrum, HMBC spectrum 측정으로 ribonucleoside의 일종인 6-amino-9-β-D-ribofuranosyl-9H-purine 즉 adenosine인 것으로 동정되었다.

팔의 ACE 저해물질 탐색을 위해서는 팔 단백질을 효소 가수분해하였을 때는 pepsin으로 8시간 가수분해하였을 때 ACE 저해율이 가장 높았고, 이를 YM-10

membrane을 사용하여 ultrafiltration하여 얻은 저분자물질을 SP-Sephadex C-25 column chromatography를 행한 결과 0.1M ammonium formate 용액으로 용출된 peak-1 과 peak-2에서 ACE 저해활성이 높았으며 이 P-1과 P-2를 ODS column chromatography 하였을 때 20-60% ethanol농도에서 가장 높은 ACE 저해활성물질이 용출되었고, 이것을 감압농축한 후 Sephadex LH-20 column chromatography 행하여 3개의 peak를 얻고, 그 중 ACE 저해활성이 가장 높은 peak A를 HPLC 행하여 4개의 획분 (F-I, F-II, F-III, F-IV)으로 나누어 분취하고, 이중 ACE 저해활성이 높은 두 번째 획분 (Fraction II)을 모아 감압농축한 후 rechromatography를 실시하여 ACE 저해활성이 가장 높은 단일 peptide peak를 얻었다. 이 단일 peptide의 아미노산 조성은 Asp>Leu>Val>Glu>Gly>Ile>Pro의 순으로 함유되었고, amino acid sequence는 N-말단으로부터 5개의 잔기까지의 아미노산배열 Phe-Val-Leu-Gly-Pro의 순서로 나타났다.

강낭콩의 ACE 저해물질 탐색을 위해서는 강낭콩 단백질은 pepsin으로 8시간동안 가수분해하였을 때 peptide-nitrogen의 생성량과 ACE 저해활성이 가장 높았다. 이 단백질 가수해물은 YM-10 membrane을 사용하여 ultrafiltration하여 얻은 저분자물질을 SP-Sephadex C-25 column chromatography를 행하여 ACE 저해율이 높은 peak-1 과 peak-2를 얻었고, 0.1M ammonium formate 용액으로 용출시켜 peak 3을 얻었다. 이 peak들은 ODS column chromatography를 행하여 0%, 20% 및 40% ethanol용액으로 용출되는 Y-1, Y-2 및 Y-3획분을 얻었다. 이중 ACE 저해활성이 높은 Y-2와 Y-3 획분을 Sephadex LH-20 column chromatography 행하여 3개의 peak를 얻었고, 이들 중 ACE 저해활성이 가장 높은 peak A를 취해 HPLC 행하여 6개의 획분 (Fraction a, b, c, d, e, f)로 분리하였고, 이중 ACE 저해활성이 가장 높은 Fraction d를 rechromatography하여 다시 6개의 획분 (d_a, d_b, d_c, d_d, d_e, d_f)을 나타내었고, 이중 ACE 저해활성이 가장 높은 Fraction d_e를 다시 rechromatography를 행하여 활성이 가장 높은 Fraction d_e-III를 얻었으며, 다시 rechromatography하여 단일 peptide peak를 얻었고, 이를 Electrospray-mass spectrometer로서 분자량이 633.09 dalton인 것으로 확인하였고, 이 단일 peptide는 N-말단으로부터 6개 잔기까지의 아

미노산 배열인 Val-Ile-Pro-Ala -Ala-Tyr의 순으로 나타났다.

브로콜리를 60% acetone으로 추출하고, water, ethylacetate 및 n-butanol로 분획하였을 때, 물층과 n-butanol층에서 각각 72.46%와 59.73%로 높은 ACE 저해활성을 보이었고, 이 중 물층을 사영하여 Amberlite XAD-2 column chromatography하였을 때, 70% 및 100% methanol fraction에서 높은 활성을 보이며 이 두 fraction 혼합물을 Sephadex LH-20 column chromatography하여 3개의 획분을 얻었으며, 이 중 높은 활성을 보인 획분 III을 사용하여 HPLC를 수행하여 6개의 획분(P-1~P-6)을 얻었고, 이 중 P-2가 94%로 가장 높은 ACE 저해활성을 보였으며, 수율도 45.5%로 높게 나타났다.

참고 문헌

1. 신 현 경 : 기능성 식품의 개발현황. 식품기술., 제7권 제3호 (1994)
2. 이 기 열 : 식이요법(음식으로 병을 고치는 법). 수학사., p216-218 (1994)
3. 鈴木文昭 : レニソーアソシオテソシソ 系の生物化學的研, 日農會誌., 67, 663(1993)
4. 受田浩之, 松田秀喜, 黒田浩之, 箴島克裕, 松藤寛, 箴島豊 : イワシ蛋白質加水分解物からのアンシオテンシン I 變換酵素阻害ペプチドの調製とその分離. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, 65(8), 1223 (1991)
5. Cushman D. W. and Sheung H. S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung, *Biochemical pharmacology*, 20, 1637 (1971)
6. 池本文彦, 山本研二郎茂 : 食品中のアンシオテンシン I變換酵素阻害ペプチドの調製. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, 65(8), 1223 (1991)
7. Sweet, C. C. and Stone, C. A. : A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature*, 228, 280 (1980)
8. Hazato, T. and Kase, R. : Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from porcine plasma. *Biochem Biophys Res Com*, 139(1), 52(1986)
9. Ferreira, S. H., Bartelt, D. C., Greene, L. J. : Isolation of bradykinin-potentiting peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, 9(13), 2583 (1970)
10. Ondetti, M. A., Williams, N. J., Sabo, E. F., Pluscec, J., Weaver, E. R., Kocy, O. : Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, 19(22), 4033(1971)
11. Cushman, D. W., Cheng, H. S., Sabo, E. F., Ondetti M. A. : Design of

- potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry*, 16(25), 5484(1977)
12. Cushman, D. W., Ondetti, M. A. and Rubin, B. : Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Science*, 196, 441(1977)
13. Oshima, G., Shimabukuro, H., Nagasawa, K. : Peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochem Biophysic Acta.*, 566, 128(1979)
14. Maruyama, S., Suzuki, H. : A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, 46(5), 1339(1982)
15. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N., Suzuki, H. : Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity in the uterus and ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49(5), 1405(1985)
16. Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N., Suzuki, H. : Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α_{S1} -casein. *Argic. Biol. Chem.*, 51(9), 2557(1987)
17. Kohmura, M., Nio, N., Kubo, K., Minoshima, Y., Munekata, E., Ariyoshi, Y. : Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein. *Argic. Biol Chem.*, 53(8), 2107(1989)
18. Kohmura, M., Nio, N., Ariyoshi, Y. : Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fregments of human κ -casein. *Argic. Biol. Chem.*, 54(3), 835(1990)
19. Kohmura, M., Nio, N., Ariyoshi, Y. : Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fregments of various β -caseins. *Agric. Biol. Chem.*, 54(4), 1101(1990)

20. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H., Maruyama, S. : Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -Zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55(5), 1313 (1991)
21. Miyoshi, S., Kaneko, T., Yoshizawa, Y., Fukui, F., Tanaka, H., Maruyama, S. : Hypertensive activity of enzymatic α -Zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55(5), 1407(1991)
22. Maruyama, S., Miyoshi, S., Kaneko, T., Tanaka, H. : Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric. Bio. Chem.*, 53(4), 1077(1989)
23. Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., Osajima, Y. : Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus lichniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(6), 922(1993)
24. 김선봉, 이태기, 박영범, 염동민, 김외경, 변한석, 박영호 : 수산 발효식품중의 Angiotensin-I 전환효소저해제의 특성. *한국수산학회지*, 26(4), 321(1993)
25. 김선봉, 이태기, 박영범, 염동민, 김외경, 도정룡, 박영호 : 멸치육 단백질 효소가수분해물로부터 Angiotensin-I 전환효소 저해제의 분리 및 그 특성. *한국수산학회지*, 27(1), 1(1994)
26. 염동민, 이태기, 변한석, 김선봉, 박영호 : 효소에 의한 고등어 근육단백질 가수분해물의 Angiotensin - I 전환효소 저해작용. *한국수산학회지*, 25(3), 229(1992)
27. 염동민, 이태기, 도정룡, 김외경, 박영범, 김선봉, 박영호 : 수산발효식품중의 Angiotensin- I 전환효소저해제의 특성. *한국수산학회지*, 26(5), 416(1993)
28. Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M., Mimura, T. : Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 155(1), 332(1998)

29. Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K., Shimizu, T. :
Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels
autolysate. Biosci. Biotech. Biochem., 57(5), 695, (1993)

30. 關 英治, 箴島克裕 松井利郎, 箴島 豊 : イワシ筋肉アルカリプロテア - ゼ分解か
らアンジオテンシン I 變換酵素阻害能についての分離精製. *Nippon Shokuhin Kogyo*
Gakkaishi., 40(11), 783(1993)

31. Yokoyama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M. : Peptide inhibitors for
angiotensin-I converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito.
Biosci. Biotech. Biochem. 56(10), 1541(1992)

32. 受田浩之, 松田秀喜, 箴島克裕, 松藤 寛 松井利郎, 箴島 豊 : 加熱筋肉イワシ筋
肉加水分解物中に存在するアンジオテンシン I 變換酵素阻害能について. *Nippon No-*
geikagaku Kaishi, 66(1), 25(1992)

33. 杉山圭吉, 高田康二, 江川 眞, 山本郁雄, 大陽建吉 :
魚タン加水分解物の高血壓

抑制作用. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 65(1), 35(1991)

34. 末綱邦男, 箴島克裕 : イワシおよびタチウオチ筋肉由基性のアンジオテンシン I
變換酵素阻害能について. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 52(11), 1981(1986)

35. Kinoshita, E., Yamakoshi, J., Kikuchi, M. : Purification and
identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitor from soy sauce.
Biosci. Biotech. Biochem., 57(7), 1107(1993)

36. 신재익, 안창원, 남희섭, 이형재, 이형주, 문태화 : 된장으로부터 angiotensin
- I converting enzyme (ACE) 저해 peptide의 분획. *한국식품과학회지*, 27(2),
230(1995)

37. 안상원 : 대두가수분해물의 angiotensin - I converting enzyme 저해효과., 고
려대학교 석사학위논문. 1994

38. 신재익 : 대두식품으로부터 유래된 혈압강하 펩티드의 특성 및 생산공정 최적화. 서울대학교 박사학위논문, 1997
39. Oka, H., Yamamoto, K., Teramoto, T., Okabe, M., Mimura, T., Nagase, Y., Chiba, Y., Fujita, T. : Induction of angiotensin -I converting enzyme inhibitory activity by acid limited proteolysis. *Biochem. Biophysic. Res. Com.*, 161(2), 456(1989)
40. 原 征彦, 松崎妙子, 鈴木建夫 : 茶成分のアンジオテンシン I 變換酵素阻害能について. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 61, 803(1987)
41. 조영제, 안봉전, 최청 : 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물의 angiotensin-I converting enzyme 저해효과. *한국식품과학회지*, 25(3), 238(1993)
42. Inokuchi, J. I., Okabe, H., Yamauchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G. I., Nishioka, I. : Inhibitors of angiotensin converting enzyme in crude drugs. II. *Chem. Pharm. Bull.*, 33(1), 264(1985)
43. Matsubara, Y., Kumamoto, H., Iizuka, Y., Murakami, T., Okamoto, K., Miyake H. : Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in Citrus unshiu peelings. *Agric. Biol.Chem.*, 49(4), 909(1985)
44. Funayama, S., Hikino, H. : Hypotensive principles of Diospyros kaki leaves. *Chem. Pharm. Bull.*, 27(11), 1143(1983)
45. 鈴木建本, 石宣川子, 目黒 熙 : 食品中のアンジオテンシン I 變換酵素阻害能について. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, 57(11), 1143(1983)
46. Rhyu, M. R., Nam, Y. J. and Lee, H. Y. : Screening of angiotensin -I converting enzyme inhibitors in cereals and legumes. *Foods and Biotechnology*, 5(4), 334(1996)
47. 도정룡, 김선봉, 박영호, 김동수 : 기호음료성분의 Angiotensin I 전환효소 저해작용 : *한국식품과학회지*, 25(5), 456(1993)
48. 염동민 : 단백질 효소가수분해물의 기능특성, 부산수산대학교 박사학위 논문

(1991)

49. Seki, E, Osajima, K., Matsui, T., and Osajima, Y. : Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokukin Kogyo Gakkaishi*, 40(11), 783(1993)
50. Chung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F. and Cushman, D.W. : Binding of peptide substrates and inhibitor of angiotensin converting enzyme. *J.Bio.Chem.* 225(2), 401(1997)
51. Montecalvo, J. Constantinides, S.M, and Yang, C.S.T. Optimization of processing parameters for the preparation of flounder frame protein product. *J. Food Sci.*, 49, 172(1984)
52. Umemoto, S. : A modified method for estimation of fish muscle protein by biuret method, *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 32(5), 427(1996)
53. Ukeda, H, Matsuda, H, Kuroda, H, Osajima, K : Preparation and separation of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 65(8), 1223(1991)
54. Maruyam, S, Miyosh, S. and Tanaka, H : Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric. Bio. Chem.* 53(10), 2763(1989)
55. Ukeda, H. Matsuda, H. Kuroda, H, Osajima, K, : Preparation and separation of angiotensin - I converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkalined protease hydrolysates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotechnol.Biochem.*, 57(6), 922(1993)

제2장 순환기질환 예방 소재의 in vivo 평가

제1절 서론

1. 연구의 배경

국민 소득의 증가에 따라 우리 나라에서의 질환 발병은 점점 선진국형으로 바뀌어가고 있다. 93년의 주요사망 원인을 보면 순환기계 질환이 30.2%, 각종 암 21.4%, 각종 사고사 14.8%, 소화기계 질환 8.2%, 호흡기계 질환이 4.9% 순으로 보고되어 있다. 이러한 사망 원인 중에서도 순환기계 질환은 83년의 27.9%에서 93년에 30.2%로 증가하였다.

순환기계 질환의 종류는 고혈압, 심장병, 뇌졸중(중풍) 동맥경화증, 허혈성 심질환 등의 심장 및 혈액 순환과 관련 있는 질병을 총칭한다. 연령이 증가함에 따라 즉 50세 이상이 되면 순환기 질환으로 인한 사망률이 점점 높아지는 경향을 보인다. 83년부터 93년까지 허혈성 심질환으로 사망한 사람은 가장 급격히 증가하여 83년 2.2명에서 93년 13.5명으로 6배 이상 증가하였다.

순환기계 질환은 평균수명이 높은 선진국에서 비중이 높은 사인으로 우리 나라의 경우 흡연, 스트레스, 육류 섭취 등의 증가로 장래에도 계속하여 증가할 것으로 예상된다. 93년의 의료보험 공단에서 순환기계 질환의 치료에 지급한 진료비만 하더라도 381만 여건에 24,562,870천원에 이른다. 따라서 순환기계 질환의 예방 및 질병의 회복을 위한 기능성 식품의 탐색 및 개발은 필수적이다.

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

(1) 세계적인 선진 식품 기업들의 많은 수가 범세계적으로 기능 식품 소재를 수집하여 이들로부터 새로운 기능들을 개발하려는 연구 동향이 확산되고 있다.

(2) 유효 기능성 식품을 in vivo에서 효능 검색을 위한 과학적인 실험 체계를 확립

이 가능하다.

(3) In vivo 실험을 이용한 기능성 식품의 유효성 검색은 부작용 검사를 통해 기능성 식품의 안정성 검사를 병행할 수 있다.

(4) 식품, 영양, 의학 등의 유관 학문과의 연계 관계를 확립할 수 있다.

(5) 우리 나라의 생약자원 및 국산 농수산 자원을 이용한 기능성 식품 인자의 탐색은 농가의 소득 증대와 연관되어 농민의 생활수준 향상에 기여한다.

2) 경제적 측면

(1) 식물 자원을 범세계적으로 규제하는 우루과이라운드(UR) 및 생물 다양성 협약(biodiversity)을 고려할 때 자원 빈국인 한국은 국내 고유의 기능성 식품을 개발하여 부가가치 높은 작물을 재배함으로써 농촌 발전을 기대 할 수 있다.

(2) 일본, 중국 등에서는 동양에서 예전부터 사용하고 있는 약초 등을 기능 식품의 소재로 활발하게 연구들을 하고 있다(당뇨병 예방: 영지, 등).

(3) 이들과의 경쟁에서 비교 우위를 점하기 위해서는 우리 나라에서도 조속한 시일 내에 기능성 식품의 개발 체계를 마련하여야 한다.

(4) 기능성 식품으로 개발 후 유효 성분 검출에 따라 고부가가치 상품인 신약으로서의 개발 가능성도 있다.

3) 사회적 측면

생약자원 및 국산 농수산 자원으로부터 기능성 식품의 개발은 농가 소득 증대뿐만 아니라 생명과학 분야의 기초 기술 향상과 국민 보건 향상에도 기여할 것이다.

3. 연구개발의 목표

생약자원 및 국산 농수산 자원으로부터, 국민 생활 수준의 향상으로 사회 문제

화되고 있는 고혈압 및 뇌졸중의 예방 및 치료 보조 효과를 갖는 기능성 식품 소재를 선발한 다음, 선택된 식품 소재의 효능을 동물실험을 통하여 평가함으로써, 기능성 식품 개발에 필요한 동물 실험 자료를 확보하는 것이 본 연구의 최종 목표이다.

제2절 실험재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 한림대학교 실험동물부에서 사육중인 자연발증 고혈압 랫드(spontaneously hypertensive rats, SHR)를 사용하였다. 실험기간의 사육실 환경은 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$ 를 유지하였고, 12시간 인공 조명 하에서 랫드용 사육상자(polycarbonate, 42X28X18cm, 명진기계)에 한 마리씩 넣어 4주간 사육하였다. 사육상자의 깔짚은 고압증기로 소독한 것을 1주일에 1회씩 교환하였다. 실험 식이를 섞은 사료(제일제당)와 식수는 자유롭게 섭취하도록 공급하였다.

2. 생약재와 식품 소재로부터 혈압 강하 물질의 확보

본 실험에 사용한 혈압 강하 물질은 총괄 연구 책임자로부터 분양 받았다. In vitro에서 ACE(angiotensin converting enzyme) 저해능을 평가하여 혈압 강화 효과의 가능성이 높은 소재를 SHR의 수컷에 투여하였다.

1) 우슬, 감초, 브로클리의 투여

우슬, 감초, 브로클리의 혈압 강하 효과 검색은 SHR 수컷 체중 100g당 100mg농도로 음수에 녹인 후 30일간 투여하였다.

2) 마늘, 표고버섯, 두충, 상백피 및 돌미나리의 투여

마늘, 표고버섯, 두충, 상백피 및 돌미나리의 혈압 강하 효과 검색은 SHR 수컷

에 실험동물용 기본사료(조단백 20%, 조지방 3%, 조섬유 10%, 조회분 10%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%, 제일제당)에 각각 건조분말상태의 마늘 3% 및 1%, 표고버섯 5%, 두충 2%, 상백피 2% 및 들미나리 3%를 첨가하여 투여하였다.

3. 체중, 혈압 및 심박동수의 측정

체중은 실험 시작 전과 실험 식이 투여 후 1주일 간격으로 측정하였다. 수축기, 확장기 혈압 및 심박동수는 tail-cuff법을 이용한 랫드용 자동 혈압측정기(blood pressure monitor, Muromachi Co., Japan)로 측정하였다. 혈압을 측정하기 전에 2주일 동안 warmer에 있는 시간을 차츰 늘여 가면서 랫드를 혈압 측정 기계에 적응시킨 후, 정전기 방지 랫드 보정틀에 랫드를 고정시키고 37℃ 항온 chamber에서 15분간 안정시킨 다음, 한 동물에서 5회 이상 반복 측정하여 평균치를 사용하였다. 수축기, 확장기 혈압 및 심박동수는 실험 시작전과 실험 식이 투여 후 1주일 간격으로 일정한 시간에(13:00-17:00) 측정하였다.

4. 혈액중 지질 성분의 분석

실험종료 후 실험동물을 16시간 동안 절식시킨 후 에테르로 마취시켰다. 복대동맥에서 heparin(Sigma, USA) 처리한 주사기로 채혈하였으며, 채혈한 혈액은 3000rpm (4℃)에서 10분간 원심 하여 혈장을 분리하였고, 혈액중 각종 지질 성분은 Photometer (Photometer 4020, Hitachi & Boehringer Mannheim, Japan)를 이용하여 측정하였다.

1) 총 콜레스테롤 분석

혈장 중의 총 콜레스테롤의 농도는 총 콜레스테롤 측정용 kit(CHOD, Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 Photometer (Photometer 4020, Hitachi & Boehringer Mannheim, Japan)로 측정하였다. 측정원리는 cholesterol esterase(CES)의 작용에 의해 에스테르형 콜레스테롤을 유리형 콜레스테롤로 분해시킨 후

cholesterol oxidase에 의해 유리형 콜레스테롤을 산화시켜 과산화수소(H_2O_2)를 생성시킨다. 이 과산화수소를 peroxidase, 4-aminoantipyrine, 3,5-dimethoxyaniline sulfonate에 의해 산화 촉합 시켜 발색시킨 후 546nm에서 흡광도를 측정하여 총 콜레스테롤을 산출하였다.

2) High density lipoprotein(HDL) 콜레스테롤 분석

혈장 중의 HDL-콜레스테롤 농도는 HDL-콜레스테롤 측정용 kit(HDL-C, Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하였다. 혈장 0.2ml에 침강시약 0.5ml을 가하여 혼합한 후 실온에서 10분간 방치한 다음 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 HDL이외의 lipoprotein을 침강시킨다. 상층액 0.1ml을 취하여 효소시약 1ml을 가하고 상온에서 10분간 반응시킨 후 546nm에서 측정하여 산출하였다.

3) 중성지질의 분석

혈장 중의 중성지질은 중성지질 측정용 kit(TG, Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하였다. 혈장 0.01ml에 시약 1.0ml을 넣고 잘 혼합하여 실온에서 10분간 반응 시킨 후 546nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

4) Low density lipoprotein(LDL) 콜레스테롤의 계산

LDL 콜레스테롤의 계산은 Friedwald 방정식(Mackness와 Durrington, 1992)을 이용하여 총 콜레스테롤에서 HDL 콜레스테롤과 중성지방의 1/5을 공제하여 계산하였다.

5) 동맥경화지수, HTR 및 LTR의 계산

심혈관계질환의 위험도 판정 방법으로 동맥경화지수 (Atherogenic Index : AI: $(\text{Total cholesterol} - \text{HDL-cholesterol}) / \text{HDL-cholesterol}$], HTR ($\text{HDL-cholesterol} / \text{Total cholesterol}$) 및 LHR ($\text{LDL-cholesterol} / \text{HDL-cholesterol}$)를 사용하였다.

5. 조직학적 검사

실험 종료 일에 각 군의 실험동물을 16시간동안 절식시킨 후 에테르 마취 하에 도살하여 심장 및 신장을 적출 하였다. 적출 장기는 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정시켰다.

1) 육안 해부학적 조사

일반적인 부검 방법에 따라 랫드를 해부하고 육안적으로 관찰할 수 있는 이상 여부를 조사하였으며, 작은 장기는 실체 현미경(Nikon, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

2) 조직처리 및 절편 제작

조직 내에 남아 있는 포르말린을 제거하기 위해 흐르는 물에 충분히 수세하고 에탄올 탈수과정을 거쳐, 파라핀 포매를 하였다. 포매된 조직을 4 μ m 두께로 절편을 제작(Reichert-Jung, Germany)하여 염색에 사용하였다.

3) 염색 및 관찰

염색은 탈 파라핀 과정을 거쳐 hematoxylin & eosin 염색을 하였다. 염색한 절편은 영구 보존을 위해 Entellan 봉입제를 사용하여 cover glass를 덮고 난 후 광학 현미경(Reichert-Jung, Germany)으로 관찰하였다.

6. 뇌졸중 모델 개발

협기성 챔버내에서 성숙된 신경세포를 포도당과 산소가 결핍된 혐기성 혼합가스로 포화된 배양액으로 35-60분 동안 노출 시킨, 산소 및 포도당을 포함하는 MEM배양액으로 교환하는 방법을 이용 배양신경세포를 이용한 시험관내 뇌허혈중 모델을 확립하였다.

1) 흥분성 아미노산 유발 급성 신경 독성 모델의 확립

수정 후 15-17일된 마우스의 대뇌피질 신경세포를 2주간 배양 후 고농도의 흥분성 아미노산(100-500 μ M의 NMDA 혹은 glutamate)을 5-10분간 노출시킨 다음 방어물질인 MK-801처리 24시간 후에 손상 여부를 정량적으로 측정하였다.

2) 흥분성 아미노산 유발 만성 신경 독성 모델의 확립

저농도의 흥분성 아미노산 수용체 효현제인 NMDA(10-20 μ M), kainate(50 μ M), AMPA(10-15 μ M)를 20-24시간 처리하여, 차단제인 DNQX(30-50 μ M)로 유발된 손상을 억제하는 것으로 보아 이 시스템이 기능성 식품이 흥분성 아미노산으로 인한 만성 신경 독성에 보호 효과가 있는 지를 검증하는 in vitro(시험관내) 모델임을 확인하였다.

3) Mongolian gerbil에서의 전신성 뇌허혈(global ischemia) 손상 모델의 확립

Mongolian gerbil을 37 $^{\circ}$ C로 체온 조절이 되는 상태에서 2.5% isoflurane으로 전신마취(Ohmeda, USA)한 상태에서 경동맥 부위의 털을 깎고 피부를 절개한 다음 수술적 방법으로 경동맥을 노출시켜 5분간 양측 경동맥의 혈류를 차단함으로써 Mongolian gerbil에서의 전신성 뇌허혈(global ischemia) 손상 모델을 유발하였다.

6. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SAS(statistic analysis system) 및 microsoft excel 프로그램을 이용하여 실험군당 평균(Mean) \pm 표준오차(S.E.M.) 및 실험군당 평균(Mean) \pm 표준편차(S.D.)로 표시하였고 각군의 평균에 대한 유의성을 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test 및 student's t-test에 의해 검증하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 자연발증 고혈압 모델동물(spontaneously hypertensive rats, SHR) 및 대조군(Wister Kyoto rats, WKY)의 체중 및 혈압의 변화

1) 체중의 변화

자연발증 고혈압 모델동물(SHR)과 대조군(WKY) 랫드의 체중을 생후 8, 10, 12, 14, 28, 40주에 측정하였다. SHR은 생후 10주부터 WKY비해 체중 증가가 적었다. 생후 40주령의 체중을 비교해 보면 SHR의 암컷 및 수컷이 각각 210.6 ± 14.0 , 320 ± 25.2 로, 같은 주령의 WKY에 비해 암수 각각 15.8%, 9.2% 낮은 증가율을 보였다. 그러나 SHR과 WKY는 측정 전 기간을 통하여 체중이 증가하였으며, 암컷이 수컷에 비해 전반적으로 낮은 수치를 보였다(Table 1).

2) 혈압의 변화

WKY 랫드 군은 생후 8주의 수축기 혈압이 암수 각각 122.0, 117.0 mmHg였고 확장기 혈압은 87.5, 90.3 mmHg이었으며, 연령이 증가함에 따라 조금씩 증가하여 생후 40주에는 수축기 혈압이 암수 각각 149.7, 164.3 였고 확장기 혈압은 100.3, 106.1 mmHg였다. SHR 랫드 군은 생후 8주부터 수축기 혈압이 암수 각각 173.2, 165.5 mmHg이었으며 확장기 혈압은 암수 각각 132.5, 128.0 mmHg이었으나, 이 후 지속적인 혈압의 상승 경향을 보여 생후 40주령에는 수축기 혈압이 암수 각각 248.3, 252.3 mmHg, 확장기 혈압은 암수 각각 175.8, 176.5 mmHg 였다(Table 2,3). 이상과 같은 결과는 자연발증 고혈압 모델동물(SHR)은 혈압 강하 억제 소재의 효능 검정에 유용하리라 사료되었다.

Table 1. Changes of body weight in WKY and SHR.

Strain	Sex	Age(weeks)					
		8	10	12	14	28	40
WKY	M	223.6±21.0†	245.3±20.1	275.0±20.5	291.3±24.2	324.6±11.0	353.0±45.5
	F	176.5±18.2	223.0±17.2	226.0±16.5	230.7±14.7	242.0±31.6	250.0±21.4
SHR	M	224.4±25.3	250.9±24.9	254.0±22.1	277.0±28.0	307.4±4.8	320.4±25.2
	F	151.5±6.5	170.0±16.5	171.0±18.3	182.5±12.7	203.5±2.9	210.6±14.0

1) †: Mean ± S. D.(g)

Table 2. Changes of systolic blood pressure of WKY and SHR.

Strain	Sex	Age(weeks)					
		8	10	12	14	28	40
WKY	M	117.0±17.0†	125.3±20.2	125.0±14.9	132.4±24.5	145.7±13.0	164.3±31.9
	F	122.0±12.5	125.5±17.5	124.7±16.8	125.6±14.9	140.8±16.3	149.7±24.1
SHR	M	165.5±25.3	170.0±20.9	182.7±22.5	179.3±29.5	227.1±29.2	252.3±24.6
	F	173.2±15.3	170.5±21.5	176.9±17.5	189.5±11.0	216.9±16.9	248.3±24.2

1) †: Mean ± S. D. (mmHg)

Table 3. Changes of diastolic blood pressure of WKY and SHR.

Strain	Sex	Age(week)					
		8	10	12	14	28	40
WKY	M	90.3±16.5 [†]	86.9±20.1	93.9±20.5	88.9±24.2	92.3±15.2	106.1±22.9
	F	87.5±18.2	83.5±17.2	92.2±16.5	90.3±14.7	99.0±16.8	100.3±22.7
SHR	M	128.0±25.3	130.5±24.9	137.5±22.1	147.8±28.0	165.6±31.5	176.5±30.9
	F	132.5±6.5	136.5±16.5	129.9±18.3	138.0±12.7	140.8±10.0	175.8±22.1

1) †: Mean ± S. D. (mmHg)

2. 뇌졸중 모델 개발

1) 허혈성 뇌졸중의 시험관 모델 개발

허혈성 챔버내에서 배양 신경세포를 포도당 및 산소를 결핍시킨 배양액으로 갑자기 교환하고 40-60분 후 산소 및 포도당이 있는 정상 배양액으로 바꾸어 주는 조작시 흥분성 아미노산 독성이 전형적으로 관찰되는 신경세포의 팽창을 볼 수 있었으며 20-24시간 뒤 세포손상을 형태학적, 정량적으로 관찰할 수 있었다.

뇌졸중으로 인한 뇌신경 세포의 주 손상 원인으로 신경 전달 물질인 글루타메이트의 수용체에 작용하는 여러 효현약물들의 작용시간에 따른 신경독성의 형태를 구분하여 기능성 식품의 효능을 검색 할 수 있도록 기준을 확립하였다.

(1) 지연형 신경독성

AMPA : 10 μ M 농도로 20-24 시간 처리시 70-90 %의 신경세포 손상

Kainate : 50 μ M 농도로 20-24 시간 처리시 50-70 %의 신경세포
손상

NMDA : 10-20 μ M 농도로 20-24 시간 처리시 50-90 %의 신경세포
손상

(2) 급성 신경독성

NMDA : 300 μ M 농도로 5분간 처리시 50-80 %의 신경세포 손상

2) 뇌졸중 모델동물인 Mongolian Gerbil을 이용한 global ischemia 모델 확립

Isoflurane 마취 상태에서 양측 경동맥을 5분간 결찰한 후 재관류시 4-7일 뒤 학습 및 기억을 관장하는 뇌 해마부위의 CA1 신경세포의 손상이 뚜렷이 일어남을 관찰하였고 현미경하에 신경세포의 수를 세어 신경세포의 손상 정도를 정량적으로 평가하는 방법을 확립하였다(그림 1)

수술시 온도 변화에 따른 CA1 신경세포의 방어에 대한 기초적 실험자료를 얻고자 저체온을 유발하는 처리를 하였을 시 뇌허혈시 일어나는 직장온도의 상승을 억제하

였으며 이와 비례하여 CA1 신경세포의 손상을 억제하는 결과를 나타내었다(그림 2)

3) 식물정유성분이 뇌허혈에 미치는 영향

정향 식물에서 분리한 주성분인 eugenol에 대해 뇌졸중 예방 및 치료작용을 검사하기 위해 용량별로 (50-200mg/kg) 뇌졸중 모델동물인 Mongolian gerbil에 투여하였을 때 용량 의존적으로 뇌손상을 억제함을 확인하였다. 이 연구결과에서 기존의 글루타메이트 수용체 가운데 하나인 NMDA수용체 차단제로 알려진 MK-801 투여 시에 나타나는 체온 강하 효과가 이 식물의 정유성분에도 나타남을 확인하였다. 특히, 100-200mg/kg투여용량에서는 뇌 허혈시 유발되는 체온 상승 효과를 억제할 뿐 아니라 최고 농도에서는 인위적으로 체온을 37℃로 유지시켰을 시에도 30-50%정도의 뇌 손상 억제효과를 관찰할 수 있었다.

4) 감식초 및 솔잎 엑기스가 뇌허혈에 미치는 영향

Mongolian gerbil에서 전신성 뇌허혈 유발로 인한 해마(CA1)부위의 신경세포 손상에 대한 감식초 및 솔잎엑기스의 방어효과를 검증하기 위해, 감식초 및 솔잎엑기스를 전신성 뇌허혈 유발 4일전부터 실험 마지막 날까지 투여한 후 전신성 뇌허혈을 유발시켜 해마부위의 신경세포 손상을 정상군 및 대조군과 비교하였다. 정상군에서 해마 CA1 부위 신경세포의 조직학적 손상은 전혀 관찰할 수 없었으며, 감식초 및 솔잎엑기스 투여군에서는 대조군과 같은 정도의 손상을 보였다.

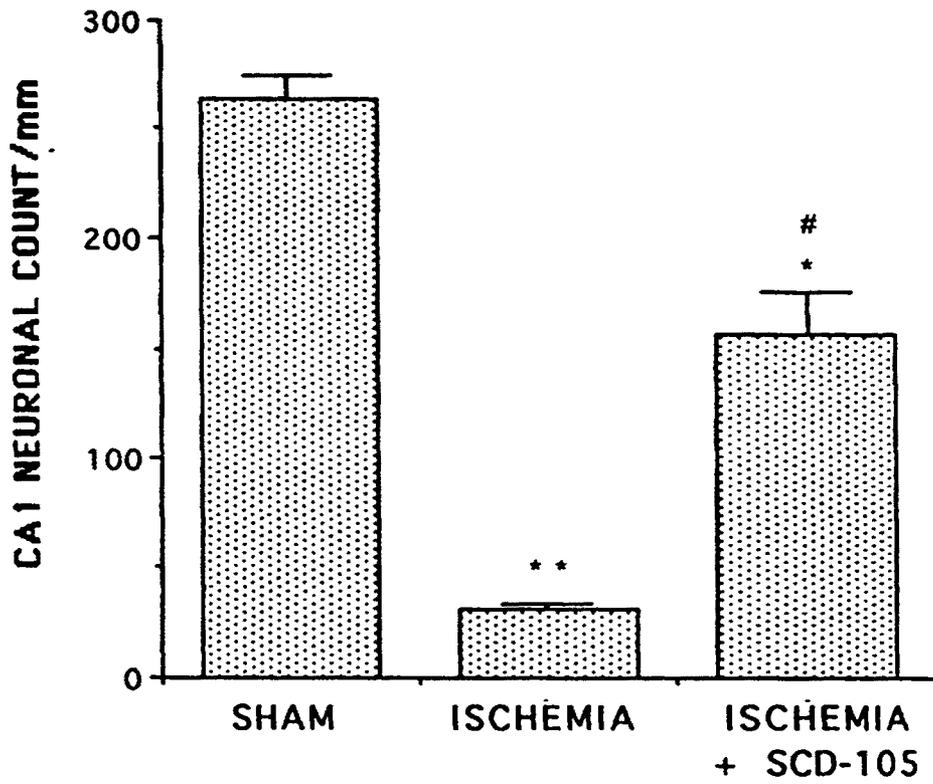


Figure 1. CA1 neuronal cell count in the global ischemia model.

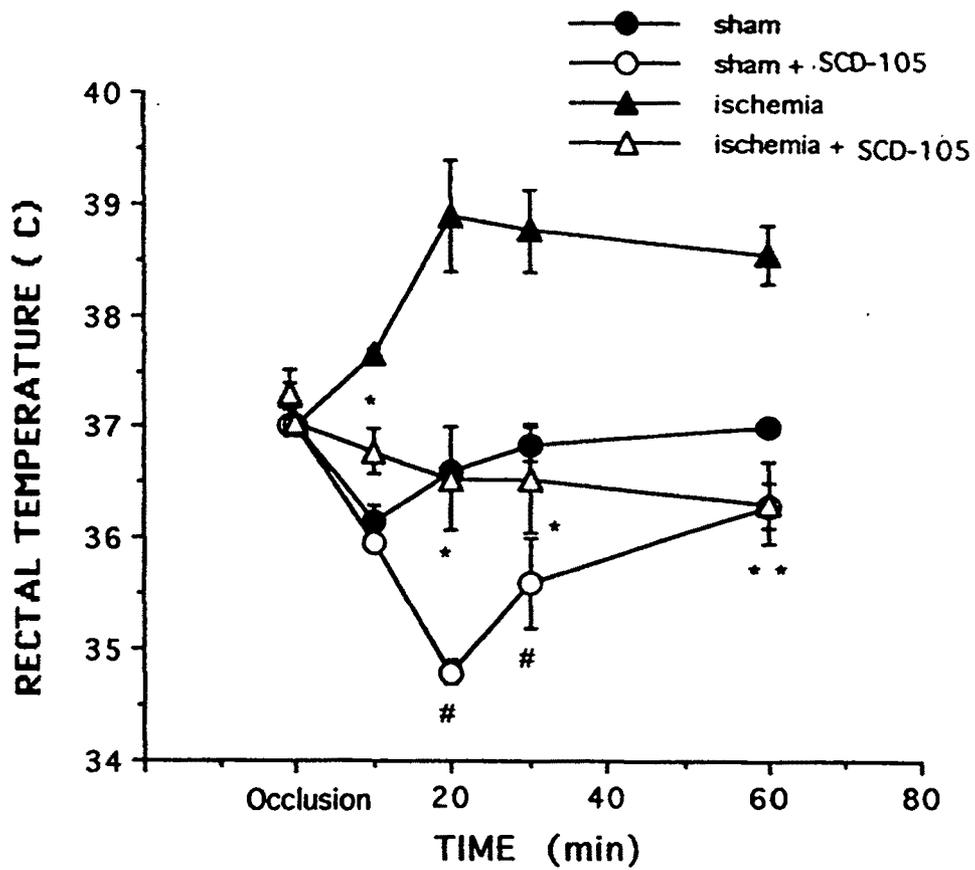


Figure 2. Rectal temperature in the global ischemia model

3. 우슬, 감초, 브로클리가 노령화된 SHR(10개월)의 혈압에 미치는 영향

1) 체중의 변화

혈압 강하 소재의 투여시 SHR의 체중을 보면 대조군이 $324.4 \pm 24.2g$, 우슬 투여군이 $365.2 \pm 8.49g$, 감초 투여군이 $317.6 \pm 15.3g$, 브로클리 투여군이 $306.6 \pm 29.1g$ 였으나, 30일간 투여 후에는 대조군이 $297.0 \pm 21.2g$, 우슬 투여군이 $366.0 \pm 15.1g$, 감초 투여군이 $304.0 \pm 18.3g$, 브로클리 투여군이 $281.8 \pm 45.9g$ 으로 우슬을 제외한 전 실험군에서 체중은 조금씩 감소하는 경향을 보였다(Table 4).

2) 혈압의 변화

(1) 수축기 혈압의 변화

혈압 강하 효과의 판단기준이 되는 혈압은 투여 실험 직전에 우슬군이 $235.5 \pm 10.6mmHg$, 감초군이 $261.2 \pm 22.7mmHg$, 브로클리군이 $264.8 \pm 20.2mmHg$ 이였고, 30일간 투여후에는 우슬군이 $229.4 \pm 22.1mmHg$, 감초군이 $249.5 \pm 33.2mmHg$, 브로클리군이 $237.0 \pm 46.5mmHg$ 였다(Table 5). 이러한 결과는 우슬, 감초, 브로클리군에서 각각 6, 12, 27mmHg 혈압이 떨어졌으나 대조군에서도 혈압이 떨어져 투여한 실험 식이의 혈압 강하 효과 유무는 단정할 수 없었다.

(2) 확장기 혈압의 변화

확장기 혈압은 투여 실험 직전에 우슬군이 $168.8 \pm 7.41mmHg$, 감초군이 $189.4 \pm 17.8mmHg$, 브로클리군이 $194.4 \pm 15.5mmHg$ 였으나, 30일간 투여 후에는 우슬군이 $157.2 \pm 16.6mmHg$, 감초군이 $176.5 \pm 20.5mmHg$, 브로클리군이 $163.0 \pm 45.4mmHg$ 였다 (Table 6). 이러한 결과는 전투여군에서 확장기 혈압이 떨어 졌으나, 대조군에서도 비슷한 양상을 보여 투여한 실험 식이에 의한 효과보다는 노령화된 SHR의 특징으로 사료되었다.

(3) 심박동수의 변화

투여 실험 직전의 심박동수는 우슬군이 408.5 ± 45.9 회, 감초군이 446.4 ± 31.3 회, 브로클리군이 472.2 ± 10.4 회 였으나, 30일간 투여 후에는 우슬군이 360.8 ± 33.8 회, 감초군이 470.0 ± 32.5 회, 브로클리군이 417.8 ± 51.5 회 였다(Table 7). 실험 식이 투여 시작시는 전 실험군에서 유의차가 없었으나 투여 10일후부터 우슬 투여군은 대조군과 비교할 때 유의한($p < 0.05$)심박동수의 감소를 보였다.

3) 지질치의 변화

(1) 총 콜레스테롤

혈압 강하 억제 소재 투여전의 총 콜레스테롤은 우슬군이 86.4 ± 16.8 mg/dl, 감초군이 68.4 ± 8.53 mg/dl, 브로클리군이 79.0 ± 12.7 mg/dl 였으나, 30일간 투여 후에는 우슬군이 82.4 ± 6.23 mg/dl, 감초군이 64.5 ± 2.12 mg/dl, 브로클리군이 93.7 ± 11.3 mg/dl 였다(Table 8). 투여 실험 시작 전후를 비교했을 때 총 콜레스테롤은 우슬 및 감초군에서는 감소를 브로클리군에서는 증가하는 경향을 보였다.

(2) 중성지방

혈압 강하 억제 소재 투여전의 plasma triglyceride는 우슬군이 124.6 ± 45.4 mg/dl, 감초군이 84.4 ± 19.5 mg/dl, 브로클리군이 117.4 ± 32.4 mg/dl 였으나, 30일간 투여 후에는 우슬군이 89.0 ± 38.0 mg/dl, 감초군이 52.0 ± 17.0 mg/dl, 브로클리군이 66.3 ± 12.4 mg/dl로 실험 전 군에서 감소하는 경향을 나타내었다(Table 9). 브로클리 투여군은 투여 실험 시작시와 비교했을 때 투여 20일 후부터 중성지방의 유의한 감소($p < 0.05$)를 보였다.

(3) HDL 콜레스테롤

혈압 강하 억제 소재 투여전의 HDL-콜레스테롤은 우슬군이 48.4 ± 8.87 mg/dl, 감초군이 40.9 ± 9.64 mg/dl, 브로클리군이 40.4 ± 7.21 mg/dl 였으나, 30일간 투여

후에는 우슬균이 47.9 ± 11.4 mg/dl, 감초균이 35.9 ± 1.70 mg/dl, 브로클리균이 46.1 ± 14.1 mg/dl로 우슬 및 감초에서는 감소를 브로클리균에서는 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의차는 없었다(Table 10).

이상의 결과를 종합해보면 우슬, 감초, 브로클리가 생후 10개월령의 자연발증 고혈압 랫드(SHR)의 혈압에 미치는 영향은 확실하지 않았다. 이러한 결과는 in vitro에서의 실험 결과와 상반된 것으로 좀더 자세한 효과 검색과 고혈압 예방 효과를 관찰하기 위해서 혈압이 상승하기 시작하는 SHR을 이용하여 재검토하는 것이 필요하다고 판단되었다.

Table 4. Changes of body weight in 10 month-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 30 days.

Group	Age(days)			
	0	10	20	30
SHR-Control (n=5)	324.4±24.2 [†]	291.7±2.89	293.5±10.6	297.0±21.2
SHR- <i>Achyrantheo japonica Nakai</i> (n=5)	365.2±8.49	369.5±16.5	367.0±16.5	366.0±15.1
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	317.6±15.3	306.0±19.7	305.0±19.1	304.0±18.3
SHR-Broccoli (n=5)	306.6±29.1	283.0±51.1	279.0±47.8	281.8±45.9

1) †: Mean ± S. D.(g)

Table 5. Changes of systolic blood pressure in 10 month-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 30 days.

Group	Age(days)			
	0	10	20	30
SHR-Control (n=5)	243.8±19.9 [†]	237.7±17.0	226.5±0.70	209.0±19.8
SHR- <i>Achyrantheo japonica Nakai</i> (n=5)	235.5±10.6	257.3±18.4	245.9±6.32	229.4±22.1
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	261.2±22.7	252.0±19.8	250.8±26.5	249.5±33.2
SHR-Broccoli (n=5)	264.8±20.0	250.2±19.3	245.4±21.2	237.0±46.5

1) †: Mean ± S. D. (mmHg)

Table 6. Changes of diastolic blood pressure in 10 month-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 30 days.

Group	Age(days)			
	0	10	20	30
SHR-Control (n=5)	178.6±23.4 [†]	157.7±11.7	151.8±6.72	141.5±26.2
SHR- <i>Achyrantheo japonica</i> Nakai (n=5)	168.8±7.41	182.0±21.7	171.9±4.73	157.2±16.6
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	189.4±17.8	185.5±26.1	181.0±23.3	176.5±20.5
SHR-Broccoli (n=5)	194.4±15.5	179.0±17.2	173.3±21.0	163.0±45.4

1) †: Mean ± S. D. (mmHg)

Table 7. Changes of heart rate in 10 month-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 30 days.

Group	Age(days)			
	0	10	20	30
SHR-Control (n=5)	402.0±50.3 [†]	479.3±3.78	462.0±4.24	445.5±3.53
SHR- <i>Achyrantheo japonica Nakai</i> (n=5)	408.5±45.9	373.0±21.6*	360.7±14.9*	360.8±33.8*
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	446.4±31.3	493.0±2.82	481.5±14.8	470.0±32.5
SHR-Broccoli (n=5)	472.2±10.4	468.4±54.6	437.3±48.5	417.8±51.5

1) †: Mean ± S. D.(beats/min)

2) *: significantly different at the p<0.05 level compared with control group by student's t-test.

Table 8. Changes of plasma total cholesterol in 10 month-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 30 days.

Group	Age(days)			
	0	10	20	30
SHR-Control (n=5)	61.0±13.2†	53.0±4.24	58.5±1.41	64.0±7.07
SHR- <i>Achyrantheo japonica Nakai</i> (n=5)	86.4±16.8	91.0±5.38	86.7±3.91	82.4±6.23
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	68.4±8.53	86.0±1.53	74.5±1.52	64.5±2.12
SHR-Broccoli (n=5)	79.0±12.7	81.3±11.1	88.2±1.60	93.7±11.3

1) †: Mean ± S. D. (mg/dl)

Table 9. Changes of triglycerides in 10 month-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 30 days.

Group	Age(days)			
	0	10	20	30
SHR-Control (n=5)	93.5±10.4 [†]	38.5±4.95 [*]	45.3±3.18	52.0±1.41
SHR- <i>Achyrantheo japonica Nakai</i> (n=5)	124.6±45.4	99.6±4.83 [*]	94.3±19.8	89.0±38.0
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	84.4±19.5	79.0±4.56	59.5±1.63	52.0±17.0
SHR-Broccoli (n=5)	117.4±32.8	92.0±8.00	66.3±8.75 [*]	66.3±12.4 [*]

1) †: Mean ± S. D. (mg/dl)

2) *: significantly different at the p<0.05 level compared with 0 days by student's t-test.

Table 10. Changes of HDL-cholesterol in 10 month-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 30 days.

Group	Age(days)			
	0	10	20	30
SHR-Control (n=5)	40.8±4.72 [†]	25.3±7.22	30.6±6.05	35.6±4.88
SHR- <i>Achyrantheo japonica Nakai</i> (n=5)	48.4±8.87	50.9±10.5	49.4±5.36	47.9±11.4
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	40.9±9.64	62.4±8.65 [*]	49.8±5.26	35.9±1.70
SHR-Broccoli (n=5)	40.4±7.21	39.6±8.45	45.8±5.27	46.1±14.1

1) †: Mean ± S. D. (mg/dl)

2) *: significantly different at the p<0.05 level compared with 0 days by student's t-test.

4. 우슬, 감초, 브로클리가 젊은 SHR(8주령)의 혈압에 미치는 영향

1) 체중의 변화

투여 실험 직전의 SHR의 체중을 보면 대조군이 $239.2 \pm 11.3g$, 우슬 투여군이 $234.2 \pm 25.6g$, 감초 투여군이 $245.6 \pm 21.0g$, 브로클리 투여군이 $228.0 \pm 28.6g$ 였으나, 45일간 투여 후에는 대조군이 $307.0 \pm 27.7g$, 우슬 투여군이 $299.2 \pm 25.8g$, 감초 투여군이 $320.4 \pm 19.7g$, 브로클리 투여군이 $301.3 \pm 15.4g$ 로 전 실험군에서 체중은 증가하였다(Table 11). 감초와 브로클리 투여군은 대조군에 비해 체중 증가가 많았으며, 우슬 투여군은 대조군에 비해 체중 증가가 적었으나, 통계학적인 유의차는 없었다.

2) 혈압의 변화

(1) 수축기 혈압의 변화

투여 실험전 수축기 혈압은 우슬군이 $213.5 \pm 14.9mmHg$, 감초군이 $207.9 \pm 7.80mmHg$, 브로클리군이 $200.4 \pm 9.68mmHg$ 였으나, 45일간 투여후에는 우슬군 30일간 투여후에는 우슬군이 $224.0 \pm 25.0mmHg$, 감초군이 $229.7 \pm 14.6mmHg$, 브로클리군이 239.3 ± 19.0 으로 혈압이 조금씩 상승하는 경향을 보였다(Table 12). 감초 및 브로클리군의 혈압 상승은 대조군의 혈압 상승폭에 비해 높았으나, 우슬군의 경우는 대조군의 혈압 상승폭에 비해 낮은 경향을 보였다.

(2) 확장기 혈압의 변화

투여 실험전 확장기 혈압은 우슬군이 $142.0 \pm 12.9mmHg$, 감초군이 $145.9 \pm 8.63mmHg$, 브로클리군이 $140.1 \pm 11.1mmHg$ 였으나, 45일간 투여후에는 우슬군이 $151.1 \pm 22.7mmHg$, 감초군이 $159.1 \pm 15.9mmHg$, 브로클리군이 166.3 ± 16.3 으로 혈압이 조금씩 상승하는 경향을 보였다(Table 13). 브로클리군의 혈압 상승은 대조군의 혈압 상승폭에 비해 높았으나, 우슬군 및 감초군은 대조군의 혈압 상승폭에 비해 낮은

경향을 나타냄으로써 자연발증 고혈압 랫드에서 혈압 강화 효과는 있었으나 통계학적으로 유의차는 없었다.

(3) 심박동수의 변화

투여 실험전 심박동수는 우슬군이 416.3 ± 33.4 회, 감초군이 411.6 ± 26.3 회, 브로클리군이 418.4 ± 55.3 회 였으나, 45일간 투여후에는 우슬군이 377.3 ± 32.8 회, 감초군이 396.6 ± 45.0 회, 브로클리군이 388.2 ± 50.1 회로 심박동수가 조금씩 하강하는 경향을 보였다(Table 14). 대조군에서는 심박동수가 실험전에는 372.4 ± 50.9 회에서 45일 후에는 398.0 ± 49.1 회로 23.6회 증가한 반면 우슬, 감초 및 브로클리군에서는 각각 39, 15, 30.2회 감소를 하였으나 통계학적인 유의차는 없었다.

3) 지질치의 변화

(1) 총 콜레스테롤

투여 실험전 총 콜레스테롤은 우슬군이 55.3 ± 4.64 mg/dl, 감초군이 57.1 ± 15.7 mg/dl, 브로클리군이 57.7 ± 5.37 mg/dl 였으나, 45일간 투여 후에는 우슬군이 61.2 ± 12.5 mg/dl, 감초군이 60.6 ± 10.2 mg/dl, 브로클리군이 61.0 ± 6.90 mg/dl로 전 투여군에서 대조군과 유사하게 아주 적은량 총 콜레스테롤이 증가하는 경향을 보였다(Table 15).

(2) 중성지방

투여 실험전 중성지방은 우슬군이 85.7 ± 20.4 mg/dl, 감초군이 96.4 ± 17.2 mg/dl, 브로클리군이 88.1 ± 16.5 mg/dl 였으나, 45일간 투여 후에는 우슬군이 38.0 ± 4.24 mg/dl, 감초군이 50.4 ± 20.7 mg/dl, 브로클리군이 36.7 ± 5.96 mg/dl 였다 (Table 16). 두충군과 브로클리군에서는 투여 실험 시작시와 비교하여 투여후 45일의 중성지방이 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다.

(3) HDL-콜레스테롤

투여 실험전 HDL-콜레스테롤은 우슬군이 38.4 ± 5.46 mg/dl, 감초군이 42.3 ± 5.11 mg/dl, 브로클리군이 38.5 ± 5.58 mg/dl 였으나, 45일간 투여 후에는 우슬군이 35.8 ± 8.96 mg/dl, 감초군이 37.6 ± 8.49 mg/dl, 브로클리군이 40.8 ± 6.28 mg/dl 였다(Table 17). 대조군에서는 실험 시작전과 비교 했을 때 실험후 15일부터 HDL-콜레스테롤이 유의하게($p < 0.05$)감소 하였으나, 우슬 및 감초 투여군은 감소를, 브로클리 투여군은 HDL-콜레스테롤이 증가하는 경향을 보였으나 통계학적인 유의차는 없었다.

Table 11. Changes of body weight in 8 week-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 45 days.

Group	Age(days)		
	0	15	45
SHR-Control (n=5)	239.2±11.3 [†]	268.3±17.6	307.0±27.7
SHR- <i>Achyrantheo japonica</i> Nakai (n=5)	234.6±25.6	272.8±19.3	299.2±25.8
SHR - <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	245.6±21.0	288.4±21.1	320.4±19.7
SHR-Broccoli (n=5)	228.9±28.6	278.3±25.8	301.3±15.4

1) †: Mean ± S. D.(g)

Table 12. Changes of systolic blood pressure in 8 week-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 45 days.

Group	Age(days)		
	0	15	45
SHR-Control (n=5)	206.0±25.5 [†]	210.7±4.16	224.0±16.3
SHR- <i>Achyrantheo japonica</i> Nakai (n=5)	213.5±14.9	222.1±18.3	224.0±25.0
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	207.9±7.80	209.3±13.1	229.7±14.6
SHR-Broccoli (n=5)	200.4±9.68	213.1±31.2	239.3±19.0

1) †: Mean ± S. D. (mmHg)

Table 13. Changes of diastolic blood pressure in 8 week-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 45 days.

Group	Age(days)		
	0	15	45
SHR-Control (n=5)	132.8±17.8 [†]	131.5±9.36	151.3±11.3
SHR- <i>Achyrantheo japonica</i> Nakai (n=5)	142.0±12.9	135.0±13.8	151.1±22.7
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	145.9±8.63	141.2±8.28	159.1±15.9
SHR-Broccoli (n=5)	140.1±11.1	132.8±35.0	166.3±16.3

1) †: Mean ± S. D. (mmHg)

Table 14. Changes of heart rate in 8 week-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 45 days.

Group	Age(days)		
	0	15	45
SHR-Control (n=5)	372.4 ± 50.9 [†]	395.3 ± 36.9	398.0 ± 49.1
SHR- <i>Achyrantheo japonica</i> Nakai (n=5)	416.3 ± 33.4	391.7 ± 44.6	377.3 ± 32.8
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	411.6 ± 26.3	430.7 ± 45.1	396.6 ± 45.0
SHR-Broccoli (n=5)	418.4 ± 55.3	407.9 ± 53.6	388.2 ± 50.1

1) †: Mean ± S. D. (beats/min)

Table 15. Changes of plasma total cholesterol in 8 week-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 45 days.

Group	Age(days)		
	0	15	45
SHR-Control (n=5)	58.6±3.91 [†]	63.7±3.06 [*]	61.6±4.72
SHR- <i>Achyrantheo japonica Nakai</i> (n=5)	55.3±4.64	63.1±4.78 [*]	61.2±12.5
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	57.1±15.7	62.8±11.1	60.6±10.2
SHR-Broccoli (n=5)	57.7±5.37	65.7±2.73 [*]	61.0±6.90

1) †: Mean ± S. D.(mg/dl)

2) *: significantly different at the p<0.05 level compared with 0 days by student's t-test.

Table 16. Changes of triglycerides in 8 week-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 45 days.

Group	Age(days)		
	0	15	45
SHR-Control (n=5)	114.6±19.4 [†]	103.7±16.2	82.7±48.9
SHR- <i>Achyrantheo japonica Nakai</i> (n=5)	85.7±20.4	119.0±32.9	38.0±4.24 [*]
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	96.4±17.2	122.3±47.0	50.4±20.7
SHR-Broccoli (n=5)	88.1±16.5	130.5±18.9	36.7±5.96 [*]

1) †: Mean ± S. D.(mg/dl)

2) *: significantly different at the p<0.05 level compared with 0 days by student's t-test.

Table 17. Changes of HDL-cholesterol in 8 week-old SHR fed medicinal herbs (100mg/ml drinking water) for 45 days.

Group	Age(days)		
	0	15	45
SHR-Control (n=5)	39.2±1.87 [†]	44.8±1.15 [*]	32.4±7.69 [*]
SHR- <i>Achyrantheo japonica Nakai</i> (n=5)	38.4±5.46	41.3±3.98	35.8±8.96
SHR- <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (n=5)	42.3±5.11	39.4±11.0	37.6±8.49
SHR-Broccoli (n=5)	38.5±5.58	43.8±1.94 [*]	40.8±6.28

1) †: Mean ± S. D. (mg/dl)

2) *: significantly different at the p<0.05 level compared with 0 days by student's t-test.

5. 마늘, 표고버섯, 두충, 상백피가 혈압에 미치는 영향

1) 혈압의 변화

(1) 수축기 혈압의 변화

수축기 혈압은 실험 시작하기 전인 0주의 초기 수축기 혈압은 유의한 차이가 없었다. 그러나, 실험 식이를 공급한 후 1주에는 두충군에서 대조군에 비해 16.93mmHg(7.64%)를 낮추어 유의한 차이를 나타내었다. 2주에는 두충군에서 대조군에 비해 20.93mmHg(9.12%)를 낮추어 유의한 차이를 보였다. 3주 및 4주에는 대조군과 비교하여 실험 식이를 공급한 모든 군에서 유의적으로 혈압을 낮추는 결과를 보였다. 즉, 마늘, 표고버섯, 두충, 상백피를 포함하는 식이를 공급한 군에서 3주에 대조군에 비해서 각각 19.03mmHg(7.89%), 30.03mmHg(12.45%), 30.87mmHg(12.80%), 21.87mmHg(9.07%)씩 유의적으로 낮은 혈압을 보였으며, 4주에 대조군에 비해서 각각 26.5mmHg(10.73%), 36.2mmHg(14.66%), 23.4mmHg(9.47%), 23.25mmHg(9.41%)씩 낮은 혈압을 나타내었다. 특히, 마늘과 상백피 군은 초기의 수축기 혈압은 통계적으로 유의성을 보이지는 않았으나 그 증가폭이 대조군에 비하여 낮은 경향을 보였다. 표고버섯군은 3주에 2주에 비하여 17.16mmHg가 감소하여 급격한 감소 효과가 관찰되었으며 4주까지 그 혈압을 유지하는 혈압 강하효과를 얻었다(Table 18).

(2) 확장기 혈압의 변화

확장기 혈압은 실험시작전인 0주째 수축기 혈압에서와 마찬가지로 유의성을 보이지 않았으며, 실험 식이를 공급한지 2주부터 유의한 차이를 보이기 시작했다. 2주 두충군에서 16.3mmHg(10.33%)를 낮추어 유의한 차이를 보였으며, 3주에는 대조군에 비해 표고버섯은 28.23mmHg(17.07%), 두충군은 22.9mmHg(13.85%)씩 유의적으로 낮추는 효과를 보였다. 4주에는 표고버섯 첨가군에서만 25.73mmHg(15.29%)를 유의적으로 낮추는 결과를 나타내었다(Table 19)

(3) 심박동수의 변화

식이 소재 투여 직전의 심박동수는 마늘이 380.17 ± 27.37 회, 표고버섯이 398.33 ± 32.81 회, 두충이 398.33 ± 34.62 회, 상백피가 383.33 ± 17.33 회 였으나 4주간 식이 소재를 투여한 후에는 심박동수가 마늘이 352.20 ± 36.57 회, 표고버섯이 366.50 ± 20.57 회, 두충이 386.00 ± 60.33 회, 상백피가 399.25 ± 51.21 회 였다. 대조군의 심박동수가 증가한 반면 마늘, 표고버섯, 두충의 투여군에서는 심박동수가 감소하였다 (Table 20).

2) 지질 성분의 변화

식이 소재를 4주간 투여한 자연발증 고혈압 랫드(SHR)에서 지질 성분을 측정 한 결과 표고버섯 첨가군의 경우에서만 총 콜레스테롤(33.83 ± 2.48 mg/dl), 중성지방 (23.00 ± 4.52 mg/dl), HDL 콜레스테롤(22.08 ± 2.21 mg/dl) 모두에서 대조군에 비하여 유의적으로 낮았다(Table 21).

3) 심혈관계질환의 위험도 판정

심혈관계질환의 지표가 되는 동맥경화지수는 마늘, 표고버섯, 두충 및 상백피 투여군이 대조군에 비해 높은 경향을 보였으나 통계적으로 유의차는 없었다. HTR은 대조군에 비해 전 실험군에서 낮은 경향을, LHR은 대조군에 비해 전 실험군이 높은 경향을 보였으나 각 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 22).

Table 18. Changes of body weight, heart rate, blood pressure in SHR fed 3% garlic diet for 4 weeks

	Groups	Weeks					
		Control: n=4					
		3% Garlic: n=5	0	1	2	3	4
Body Weight (g)	Control	214.3 ± 8.3 [†]	235.5 ± 13.5	260.3 ± 14.6	278.3 ± 17.3	287.3 ± 13.1	
	3% Garlic	214.2 ± 13.1	226.6 ± 10.8	238.8 ± 7.1	253.4 ± 8.9	266.8 ± 10.3	
Heart Rate (beats/min)	Control	415.8 ± 7.4	391.5 ± 16.2	402.3 ± 17.6	407.0 ± 21.5	403.5 ± 12.5	
	3% Garlic	406.6 ± 22.5	421.6 ± 23.1	382.6 ± 8.0	385.0 ± 8.8	391.2 ± 9.0	
Systolic Blood Pressure (mmHg)	Control	181.5 ± 6.5	202.8 ± 10.8	202.8 ± 7.7	202.0 ± 9.5	207.8 ± 5.9 ^{a2)}	
	3% Garlic	187.6 ± 6.6	184.2 ± 5.9	189.4 ± 5.0	196.2 ± 13.5	177.4 ± 6.7 ^{b)}	
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	Control	115.8 ± 9.1	140.0 ± 5.0 ^a	135.5 ± 1.7 ^a	132.5 ± 9.8	135.0 ± 5.3 ^a	
	3% Garlic	125.4 ± 4.7	119.4 ± 2.0 ^b	119.4 ± 3.6 ^b	131.4 ± 9.2	110.8 ± 5.5 ^b	

1) †: Mean ± S.D.

2) Values within the same column with different alphabets are significantly different (p < 0.05) among groups by Duncan's multiple range test

Table 19. Weight change and food intake in SHR fed 3% watercress diet for 4 weeks.

Group	Body weight (g)		Weight gain	Food intake
	Initial	Final	(g/30days)	(g/day)
SHR-Control (n=8)	206.3±19.2 [†]	272.8±27.6	66.5±15.2	27.3±11.9
SHR-watercress (n=7)	220.2±11.7	277.6±16.5	57.4±13.0	20.4±1.89 [*]

1) †: Mean ± S. D.

2) *: significantly different at the p<0.05 level compared with control group by student's t-test

Table 20. Changes of body weight, heart rate, blood pressure in SHR fed 3% watercress diet for 4 weeks

Effects	Group control: n=8 3%watercress: n=7	Age(weeks)				
		0	1	2	3	4
Body Weight (g)	SHR-Control	198.3±20.3 [†]	245.8±23.8	249.0±19.8	255.8±22.4	258.3±22.9
	SHR-3% watercress	224.8±15.4	254.0±10.3	267.7±10.3	277.5±11.7	269.3±25.0
Heart Rate (beats/min)	SHR-Control	420.0±33.4	394.8±22.1	416.0±47.0	419.8±35.3	403.3±30.2
	SHR-3% watercress	393.7±5.0	407.5±35.5	391.5±21.3	383.5±24.9	368.7±32.6
Systolic Blood Pressure (mmHg)	SHR-Control	192.3±7.1	205.8±22.2	203.5±13.5	232.5±24.6	217.0±17.5
	SHR-3% watercress	207.8±14.6	209.8±28.3	208.5±17.4	222.0±15.3	217.3±14.2
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	SHR-Control	130.8±12.2	139.3±15.9	135.3±9.9	163.0±12.9	128.0±19.2
	SHR-3% watercress	136.3±13.1	138.2±27.9	139.7±10.5	152.8±19.4	128.7±17.5

1) †: Mean ± S. D.

Table 21. Lipid profile in SHR fed 3% watercress diet for 4 weeks.

Group	Total Cholesterol	HDL-cholester ^o 1	Triglycerides	LDL-cholester ^o 1
Control (n=8)	54.2±7.33 [†]	31.1±3.01	39.4±7.13	10.4±2.88
Watercress (n=6)	51.6±4.51	36.0±5.01 [*]	39.0±8.86	7.80±6.08

1) †: Mean ± S. D. (mg/dl)

2) *: significant different at the 0.05 level compared with control group by student's t-test

Table 22. Atherogenic index, HTR and LHR in SHR fed 3% watercress diet for 4 weeks

Group	Atherogenic ²⁾ index	HTR ³⁾	LHR ⁴⁾
Control (n=8)	0.66±0.11†	0.60±0.04	0.38±0.02
Watercress (n=6)	0.46±0.27	0.70±0.12	0.24±0.20

1) †: Mean ± S. D. (mg/dl)

2) Atherogenic index=(Total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol

3) HTR = HDL-cholesterol/Total cholesterol

4) LHR = LDL-cholesterol/HDL-cholesterol

4) 조직학적 검사

(1) 심장의 조직학적 검사

심장의 절단면을 육안적으로 관찰한 결과 무처지의 대조군 SHR랫드에 비해 실험 식이를 투여한 군에서는 심장 내강이 넓어 보였으나(그림 3), 광학현미경적 관찰에서는 별다른 조직적인 차이는 없었다(그림 4-5).

(2) 신장의 조직학적 검사

신장에서는 사구체가 두층 침가군에서 사구체 모세혈관의 내강이 대조군에 비하여 명확하게 관찰되었으며, 모세혈관 내피세포의 핵과 문어발세포 핵의 구분이 가능하였다. 이와 같은 결과는 두층 침가가 사구체 비대의 정도를 어느 정도 완화시킨 것으로 사료되며, 이러한 형태학적 변화는 혈압강하의 한 기전으로 작용하리라 사료된다(그림 6-11).

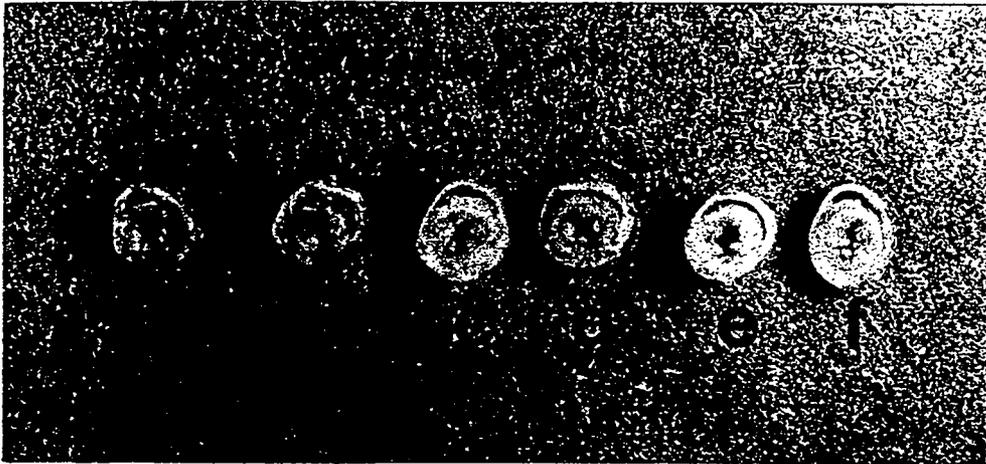


Fig 3. The cross section of hearts.

a: WKY, b: SHR, c: SHR fed 3% Garlic, d: SHR fed 5% Shiitake Mushroom e: SHR fed 2% *Eucommia Ulmoides* Oliver, f: SHR fed 2% *Morse alba* Linne Bark

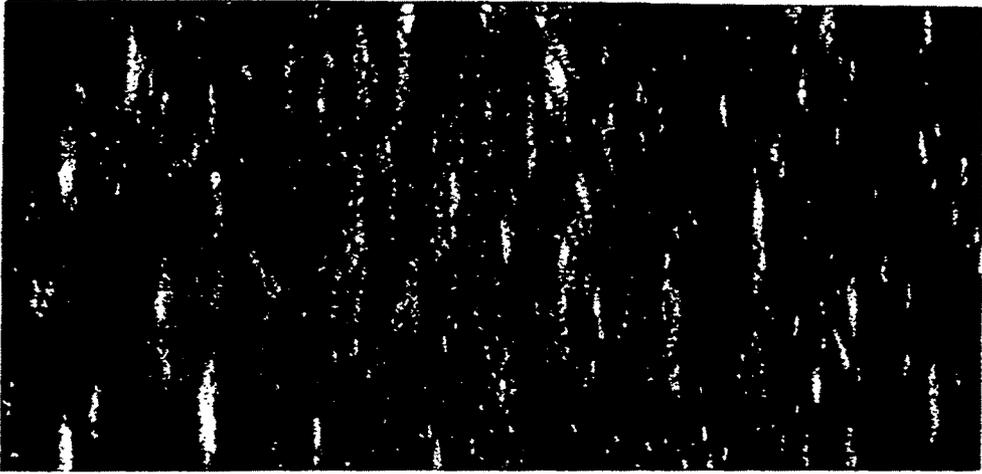


Fig 4. The myocytes in WKY, H&E stain(x400)

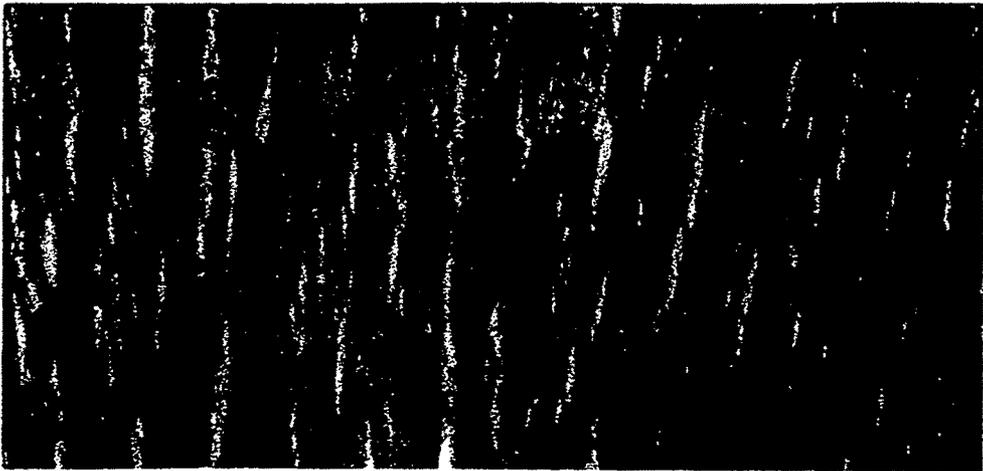


Fig 5. The myocytes in SHR, H&E stain(x400)

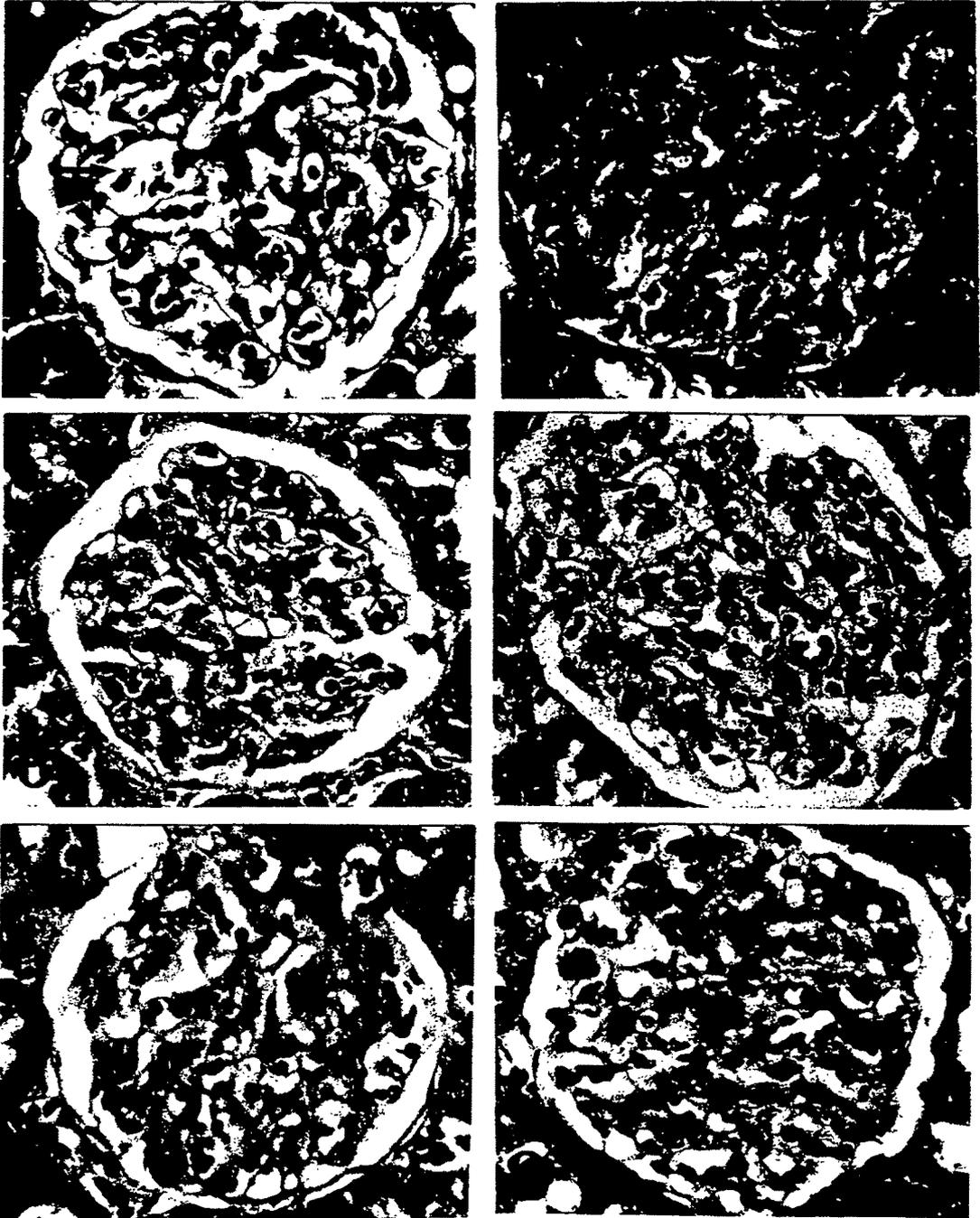


Fig 6-11. The glomerulus in WKY(4), SHR(5), SHR fed 3% Garlic(6), SHR fed 5% Shiitake Mushroom(7), SHR fed 2% *Eucommia Ulmoides* Oliver(8), and SHR fed 2% *Morse alba* Linne Bark(9).

6. 마늘이 혈압에 미치는 영향

자연 발증 고혈압 랫드(SHR)에 3%의 마늘을 4주간 투여하여 혈압 강화 효과를 반복 실험하였다.

1) 체중의 변화

4주간의 투여 실험동안 실험군의 체중은 $214.2 \pm 13.1\text{g}$ 에서 $266.8 \pm 13.1\text{g}$ 으로 52.6g 증가하여 대조군의 체중 증가량 73.0g 보다는 체중 증가가 적었다(Table 23).

2) 혈압 및 심박동수의 변화

(1) 수축기 혈압의 변화

3% 마늘을 식이로 4주간 투여하여 혈압강화 효과를 재확인한 결과 실험 시작 직전의 혈압이 $187.6 \pm 6.6\text{mmHg}$ 에서 4주 후에는 $177.4 \pm 6.7\text{mmHg}$ 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 대조군은 실험기간 동안 $181.5 \pm 6.5\text{mmHg}$ 에서 $207.8 \pm 5.9\text{mmHg}$ 로 증가하였다. 이러한 결과는 1차 실험과 유사한 결과를 나타내었다(Table 23).

(2) 확장기 혈압의 변화

실험군의 혈압은 투여 직전의 $125.4 \pm 4.7\text{mmHg}$ 에서 투여후 1, 2, 4주의 혈압이 각각 $119.4 \pm 2.0\text{mmHg}$, $119.4 \pm 3.6\text{mmHg}$, $110.8 \pm 5.5\text{mmHg}$ 으로 대조군에 비해 유의하게 확장기 혈압에서 혈압강화 효과를 보였다. 이러한 결과는 마늘을 식이로 사용할 때는 혈압강화 효과뿐만 아니라 혈압 상승을 방지하는 효과도 있음을 간접적으로 입증하고 있다(Table 23).

(3) 심박동수의 변화

투여 실험 직전의 심박동수는 대조군이 415.8 ± 7.4 회, 실험군이 406.6 ± 22.5 회 였으나, 4주간 투여후에는 대조군이 403.5 ± 12.5 회, 실험군이 391.2 ± 9.0 회로 각 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 23. Changes of body weight, heart rate, blood pressure in SHR fed 3% garlic diet for 4 weeks

	Groups	Weeks				
		Control: n=4	0	1	2	3
	3% Garlic: n=5					
Body Weight (g)	Control	214.3 ± 8.3 [†]	235.5 ± 13.5	260.3 ± 14.6	278.3 ± 17.3	287.3 ± 13.1
	3% Garlic	214.2 ± 13.1	226.6 ± 10.8	238.8 ± 7.1	253.4 ± 8.9	266.8 ± 10.3
Heart Rate (beats/min)	Control	415.8 ± 7.4	391.5 ± 16.2	402.3 ± 17.6	407.0 ± 21.5	403.5 ± 12.5
	3% Garlic	406.6 ± 22.5	421.6 ± 23.1	382.6 ± 8.0	385.0 ± 8.8	391.2 ± 9.0
Systolic Blood Pressure (mmHg)	Control	181.5 ± 6.5	202.8 ± 10.8	202.8 ± 7.7	202.0 ± 9.5	207.8 ± 5.9 ^{az)}
	3% Garlic	187.6 ± 6.6	184.2 ± 5.9	189.4 ± 5.0	196.2 ± 13.5	177.4 ± 6.7 ^{o)}
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	Control	115.8 ± 9.1	140.0 ± 5.0 ^a	135.5 ± 1.7 ^a	132.5 ± 9.8	135.0 ± 5.3 ^a
	3% Garlic	125.4 ± 4.7	119.4 ± 2.0 ^o	119.4 ± 3.6 ^b	131.4 ± 9.2	110.8 ± 5.5 ^o

1) †: Mean ± S.D.

2) Values within the same column with different alphabets are significantly different ($p < 0.05$) among groups by Duncan's multiple range test

7. 돌미나리가 혈압에 미치는 영향

1) 체중 변화 및 사료 섭취량

돌미나리 투여 실험 시작시의 대조군 및 실험군의 체중은 각각 $206.3 \pm 19.2g$, $220.2 \pm 11.7g$ 였으나, 3%의 돌미나리를 4주간 사료와 함께 투여한 이후에는 체중이 각각 $272.8 \pm 27.6g$, $277.6 \pm 16.5g$ 로 증가하였다. 4주간의 사료 섭취량은 대조군이 $27.3 \pm 11.9g$, 실험군이 $20.4 \pm 1.89g$ 으로 실험군이 대조군에 비해 유의하게 낮은 섭취량을 보였다(Table 24).

2) 혈압 및 심박동수의 변화

(1) 수축기 혈압의 변화

실험전의 혈압은 대조군과 3% 돌미나리 투여군이 각각 $192.3 \pm 7.1mmHg$, $207.8 \pm 14.6mmHg$ 으로 고혈압 상태를 보였다. 3%의 돌미나리를 사료와 함께 4주간 했을 때 수축기 혈압은 $217.3 \pm 14.2mmHg$ 으로 투여시 시작시의 혈압과 별다른 차이가 없었으며, 대조군과도 혈압의 차이를 관찰할 수 없었다(Table 25).

(2) 확장기 혈압의 변화

투여 실험 직전의 확장기 혈압은 대조군이 $130.8 \pm 12.2mmHg$, 실험군이 $136.3 \pm 13.1mmHg$ 였으나, 3%의 돌미나리를 4주간 투여한 후에는 대조군이 $128.0 \pm 19.2mmHg$, 실험군이 $128.7 \pm 17.5mmHg$ 로 대조군과 실험군 사이에 유의한 차이는 관찰할 수 없었다(Table 25).

(3) 심박동수의 변화

투여 실험 직전에 심박동수는 대조군이 420.0 ± 33.4 회, 돌미나리 투여군이 393.7 ± 5.0 회 였으나, 4주후에는 대조군이 403.3 ± 30.2 회, 실험군이 368.7 ± 32.6 회를 보여 대조군 및 실험군에서는 별다른 유의차가 없었다(Table 25).

3) 지질치의 변화

3%의 돌미나리를 4주간 투여한 후 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤은 각각 51.6 ± 4.51 mg/dl, 36.0 ± 5.01 mg/dl, 39.0 ± 8.86 mg/dl, 7.80 ± 6.08 mg/dl으로 대조군과 비교했을 때 HDL-콜레스테롤만이 유의한 차이를 보였다(Table 26).

4) 동맥경화 지수, HTR 및 LTR

3%의 돌미나리를 4주간 투여한 후 동맥경화 지수, HTR 및 LTR는 각각 0.46 ± 0.27 , 0.70 ± 0.12 , 0.24 ± 0.20 으로 동맥경화 지수 및 LHR은 대조군에 비해 감소, HTR은 대조군에 비해 상승을 하는 경향을 보여 3%의 돌미나리 투여시 심혈관계 질환으로 이완될 확률은 감소했으나, 통계학적인 유의차는 없었다(Table 27).

Table 24. Weight change and food intake in SHR fed 3% watercress diet for 4 weeks.

Group	Body weight (g)		Weight gain (g/30days)	Food intake (g/day)
	Initial	Final		
SHR-Control (n=8)	206.3±19.2 [†]	272.8±27.6	66.5±15.2	27.3±11.9
SHR-watercress (n=7)	220.2±11.7	277.6±16.5	57.4±13.0	20.4±1.89 [*]

1) †: Mean±S.D.

2) *: significantly different at the p<0.05 level compared with control group by student's t-test.

Table 25. Changes of body weight, heart rate, blood pressure in SHR fed 3% watercress diet for 4 weeks

Effects	Group control: n=8 3%watercress: n=7	Age(weeks)				
		0	1	2	3	4
Body Weight (g)	SHR-Control	198.3±20.3 [†]	245.8±23.8	249.0±19.8	255.8±22.4	258.3±22.9
	SHR-3% watercress	224.8±15.4	254.0±10.3	267.7±10.3	277.5±11.7	269.3±25.0
Heart Rate (beats/min)	SHR-Control	420.0±33.4	394.8±22.1	416.0±47.0	419.8±35.3	403.3±30.2
	SHR-3% watercress	393.7±5.0	407.5±35.5	391.5±21.3	383.5±24.9	368.7±32.6
Systolic Blood Pressure (mmHg)	SHR-Control	192.3±7.1	205.8±22.2	203.5±13.5	232.5±24.6	217.0±17.5
	SHR-3% watercress	207.8±14.6	209.8±28.3	208.5±17.4	222.0±15.3	217.3±14.2
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	SHR-Control	130.8±12.2	139.3±15.9	135.3±9.9	163.0±12.9	128.0±19.2
	SHR-3% watercress	136.3±13.1	138.2±27.9	139.7±10.5	152.8±19.4	128.7±17.5

1) †: Mean ± S. D.

Table 26. Lipid profile in SHR fed 3% watercress diet for 4 weeks.

Group	Total Cholesterol	HDL-cholesterol	Triglycerides	LDL-cholesterol
Control (n=8)	54.2±7.33 [†]	31.1±3.01	39.4±7.13	10.4±2.88
Watercress (n=6)	51.6±4.51	36.0±5.01 [*]	39.0±8.86	7.80±6.08

1) †: Mean ± S. D.(mg/dl)

2) *: significant different at the 0.05 level compared with control group
by student's t-test

Table 27. Atherogenic index, HTR and LHR in SHR fed 3% watercress diet for 4 weeks.

Group	Atherogenic ²⁾ index	HTR ³⁾	LHR ⁴⁾
Control (n=8)	0.66±0.11 [†]	0.60±0.04	0.38±0.02
Watercress (n=6)	0.46±0.27	0.70±0.12	0.24±0.20

1) †: Mean ± S. D. (mg/dl)

2) Atherogenic index=(Total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol

3) HTR = HDL-cholesterol/Total cholesterol

4) LHR = LDL-cholesterol/HDL-cholesterol

8. 마늘이 혈압에 미치는 영향(농도 실험)

자연 발증 고혈압 랫드(SHR)에 1%의 마늘을 4주간 투여하여 혈압 강화 효과 여부를 실험하였다.

1) 체중의 변화

4주간의 투여 실험동안 실험군의 체중은 $202.3 \pm 12.2\text{g}$ 에서 $290.0 \pm 10.9\text{g}$ 로 87.7g 증가하여 대조군의 체중 증가량 71.6g과 비슷하였다(Table 28). 이러한 결과는 마늘을 3% 투여한 실험군에 비해서 체중 증가량이 많았다.

2) 혈압 및 심박동수의 변화

(1) 수축기 혈압의 변화

1% 마늘을 식이로 4주간 투여하여 혈압강하 여부를 조사한 결과 실험 시작 직전의 혈압이 $198.5 \pm 6.6\text{mmHg}$ 에서 4주 후에는 $234.8 \pm 15.9\text{mmHg}$ 로 36.3mmHg 증가하였다. 이러한 수축기 혈압의 증가는 대조군의 증가량(32.8mmHg)과 유사하여 혈압강화 효과는 확인 할 수 없었다(Table 28).

(2) 확장기 혈압의 변화

실험군의 혈압은 투여 직전의 $133.3 \pm 12.1\text{mmHg}$ 에서 투여 4주 후에는 $150.8 \pm 5.4\text{mmHg}$ 으로 대조군과 유사하게 증가하여, 확장기 혈압에서도 혈압 강하 효과는 확인 할 수 없었다(Table 28).

(3) 심박동수의 변화

투여 실험 직전의 심박동수는 대조군이 404.3 ± 13.8 회, 실험군이 388.0 ± 12.3 회 였으나, 4주간 투여후에는 대조군이 382.0 ± 12.2 회, 실험군이 369.8 ± 6.1 회로 각 군간에 유의한 차이는 없었다(Table 28)

Table 28. Changes of body weight, heart rate, blood pressure in SHR fed 1% garlic diet for 4 weeks

	Groups	Weeks				
	Control: n=4					
	1% Garlic: n=6	0	1	2	3	4
Body Weight (g)	Control	208.8 ± 24.9	252.6 ± 20.2	264.6 ± 25.5	278.2 ± 33.0	281.4 ± 30.7
	1% Garlic	202.3 ± 12.2	238.5 ± 32.5	268.3 ± 23.2	288.7 ± 15.1	290.0 ± 10.9
Heart Rate (beats/min)	Control	404.3 ± 13.8	389.8 ± 14.4	399.3 ± 17.4	386.5 ± 15.1	382.0 ± 12.2
	1% Garlic	388.0 ± 12.3	389.7 ± 40.6	390.8 ± 21.9	370.4 ± 11.4	369.8 ± 6.1
Systolic Blood Pressure (mmHg)	Control	192.0 ± 6.6	211.6 ± 22.8	207.8 ± 10.9	229.4 ± 24.0	224.8 ± 9.1
	1% Garlic	198.5 ± 6.6	219.0 ± 19.1	214.0 ± 11.3	246.8 ± 6.8	234.8 ± 15.9
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	Control	136.3 ± 6.1	145.0 ± 11.3	140.5 ± 3.9	151.0 ± 19.8	146.3 ± 6.8
	1% Garlic	133.3 ± 12.1	148.7 ± 20.9	150.3 ± 13.4	165.0 ± 13.7	150.8 ± 5.4

1) †: Mean ± S.D.

제 4 절 결 론

생약자원 및 국산 농수산 자원으로부터 고혈압 및 뇌졸중의 예방 및 치료 보조 효과를 갖는 기능성 식품 소재를 선별한 다음, 선택된 식품의 효능을 검증하는 동물 실험 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 자연발증 고혈압 모델동물(spontaneously hypertensive rats, SHR)의 혈압의 변화를 생후 8, 10, 12, 14, 28, 40주에 각각 측정한 결과, 생후 10주부터 고혈압 증세(수축기 혈압 170 ± 20.9 , 확장기 혈압 130.5 ± 24.9)를 보이기 시작하여 생후 40주에는 완전한 고혈압 상태(수축기 혈압 252.3 ± 24.2 , 확장기 혈압 176.5 ± 24.6)가 됨으로써 자연발증 고혈압 모델동물(SHR)은 혈압 강하 식품 소재의 효능 검증에 유용한 모델 동물로 사료되었다.

2. 허혈성 뇌졸중에 예방 및 치료 보조 효과를 갖는 기능성 식품 소재를 일차적으로 선별하기 위한 시험관 모델을 혐기성 챔버내에서 포도당 및 산소를 결핍시킨 배양액으로 신경세포를 배양하여 흥분성 아미노산 독성에 의한 세포손상을 형태학적, 정량적으로 관찰함으로써 기능성 식품의 효능을 탐색할 수 있는 기준을 확립하였다.

3. Mongolian Gerbil의 양측 경동맥을 5분간 결찰한 후 재관류하여 4-7일 뒤 학습 및 기억을 관장하는 뇌 해마부위의 CA1 신경세포의 손상이 뚜렷이 일어남을 관찰함으로써 global ischemia의 예방 및 치료 보조 효과를 갖는 기능성 식품 소재를 효능 검증할 수 있는 모델을 확립하였다.

4. Eugenol에 대해 뇌졸중 예방 및 치료 작용을 검사하기 위해 용량별로 (50-200mg/kg) 뇌졸중 모델 동물인 Mongolian gerbil에 투여하였을 때 용량 의존적으

로 뇌손상을 억제함을 확인하였다. 이 연구결과에서 기존의 글루타메이트 수용체 가운데 하나인 NMDA수용체 차단제로 알려진 MK-801 투여 시에 나타나는 체온강하 효과가 이 식물의 정유성분에도 나타남을 확인하였다.

5. 생후 10개월의 SHR에서 우슬, 감초, 브로콜리가 혈압에 미치는 영향을 조사하기 위해 이들 실험 식이를 30일간 음수로 투여한 결과, 확장기 혈압 및 수축기 혈압이 낮아지는 경향을 보였으나 대조군에서도 혈압이 낮아져 통계학적으로 유의차는 없었다. 이러한 결과는 실험에 사용한 SHR의 연령에 의한 것으로 사료되었다.

6. 생후 2개월의 SHR에서 우슬, 감초, 브로콜리가 혈압에 미치는 영향을 조사하기 위해 이들 식이 소재를 45일간 음수로 투여한 결과, 확장기 및 수축기 혈압의 증가 폭이 우슬, 감초 투여군에서 감소하였으나, 통계적인 유의는 없었다. 한편 체중은 실험 식이 투여군 전부에서 대조군과 비슷한 증가를 보였으며, 심박동수는 대조군이 증가하는데 비해 실험 식이 투여군 전부에서 감소하였다.

7. 마늘, 표고버섯, 두충 및 상백피를 SHR에 4주간 사료와 함께 투여한 결과, 마늘 투여군이 2주째부터 대조군에 비해 수축기 혈압이 유의적으로($p<0.05$) 떨어 졌고, 투여 4주째는 모든 실험 식이 투여군에서 수축기 혈압이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 확장기 혈압은 실험 식이 투여 후 2-3주째는 두충 투여군이 3-4주째는 표고버섯 투여군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다($p<0.05$).

8. 마늘, 표고버섯, 두충 및 상백피를 SHR에 4주간 사료와 함께 투여한 후, 혈장중의 총 콜레스테롤, 중성 지질, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤의 농도를 비교한 결과 표고버섯군에서만 총 콜레스테롤 및 중성지방의 농도가 대조군에 비해 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 심혈관계 지표가 되는 동맥경화지수, HTR 및 LTR은 실험식이 투여군간에 유의적인 차이가 없었다.

9. 마늘, 표고버섯, 두충, 상백피의 섭취가 SHR의 심장 및 신장조직에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조군에 비해 마늘, 표고버섯, 두충 투여군에서 심장의 좌심실 비대의 정도가 완화된 것으로 관찰되었다. 신장에서는 대조군에 비해 실험 식이 투여 전 군에서 사구체 모세혈관이 다수 관찰되어 간질세포의 비후가 완화됨으로써 혈압 강화에 의한 것으로 추정되었다.

10. 마늘 3%를 실험 식이로 SHR에 투여하여 혈압 강하 효과를 재확인한 결과 투여 4주후에는 수축기 혈압이 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며($p < 0.05$), 확장기 혈압은 투여 후 1, 2, 4가 대조군에 비해 유의하게 낮아($p < 0.05$) 마늘의 혈압 강하 효과를 재확인 할 수 있었다. 그러나, 마늘 1%를 실험 식이로 SHR에 투여한 결과 혈압 강하 효과는 확인 할 수 없었다.

11. 돌미나리 3%를 실험 식이로 SHR에 투여하여 혈압에 미치는 영향을 조사한 결과 수축기 혈압은 대조군에 비해 증가폭의 감소를 보였으며, 확장기 혈압은 대조군에 비해 감소 폭이 증가하는 경향을 보였으나 통계학적인 유의차는 없었다. 지질치는 HDL-콜레스테롤에서 돌미나리 투여군이 대조군에 비해 유의하게 낮았으며($p < 0.05$), 동맥경화지수 및 LHR은 대조군에 비해 낮고, HTR은 대조군에 비해 높아 심혈관계 지표가 실험식이 투여군에서 개선되었다.

참 고 문 헌

Adamu I., Joseph P.K., and Augusti K.T.: Hypolipidemic action of onion and garlic unsaturated oils in sucrose fed rats over a two-month period. *Experientia*, 38, 899~901(1982)

Block E. and Ahmad S.: (E,Z)-A Potent Antithrombotic Agent from Garlic. *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 8295~8296(1984)

Bordia A.: Effect of garlic on blood lipids in patients with coronary heart disease. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 34, 2100~2103(1981)

Brandle M, al Makdessi S, Weber RK, Dietz K, Jacob R : Prolongation of life span in hypertensive rats by dietary interventions. Effects of garlic and linseed oil. *Basic Res Cardiol* : 92(4):223~232(1997)

Brunner H. R., Gavras H. and Waeber B.I: Oral angiotensin-converting enzyme inhibitor in long-term treatment of hypertensive patients. *Annals of Internal Medicine*, 90(1), 19~23(1979)

Chi M. S., Koh E. T., and Srtelling T. J.: Effect of Garlic on Lipid Metabolism in Rats Fed Cholestrol or Lard. *J. Nutr.*, 112, 241~248(1982)

Damrau F.: The use of garlic concentrate in vascular hypertension. *Med. Rec.*, 153, 249~251(1941)

Engler MM, Engler MB, Erickson SK, Paul SM. Dietary gamma-linolenic acid

lowers blood pressure and alters aortic reactivity and cholesterol metabolism in hypertension. J Hypertens : 10(10) : 1197~1204(1992)

Engler MM. Comparative study of diets enriched with evening Primrose, black currant, borage or fungal oils on blood pressure and pressor responses in spontaneously hypertensive rats. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids : 49(4) : 809~814(1993)

Hayashi U, Nagao K. Relationship between natto-added feed and blood pressure of SHR: experiment in feeding of propagation type natto Bacilli. Jpn Heart J 19(4) : 617(1978)

Hayashi U, Nagao K, Tosa Y, Yoshioka Y. Relationship between food containing "Natto"(fermented soybeans) and the blood pressure of SHR. Jpn Heart J : 17(3) : 343~344(1976)

Hoffmann P, Forster W. Antihypertensive effect of dietary sunflowerseed oil linseed oil in spontaneously hypertensive rats during a multigeneration feeding study. Prostagandins Leukot Med : 25(1) : 65~70(1986)

Hsu FL, Lu FH, Cheng JT : Influence of acetonylgeraniin, a hydrolyzable tannin from Euphoria longana, on orthostatic hypotension in a rat model. Planta Med : 60(4): 297 ~300(1994)

Inokuchi J, Okabe H, Yamauchi T, Nagamatsu A, Ncnaka G, Nishioka I. Antihypertensive substance in seeds of Areca catechu L. Life Sci 38(15) : 137

5~1382(1986)

Kabir Y., Yamaguchi M. and Kimura S. : Effect of Shiitake(*Lentinus edodes*) and Maitake(*Grifola frondosa*) Mushrooms on Blood Pressure and Plasma Lipids of Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Nutr. Sci. vitaminol.*, **79**, 580(1987)

Kendler B. S. : Garlic(*Allium sativum*) and Onion(*Allium cepa*): A Review of Their Relationship to Cardiovascular Disease. *Preventive Medicine*, **16**, 670~685(1987)

Kinoshita and Development Division, Kikkoman Corporation, Chiba, Japan. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci Biotechnol Biochem* : **57**(7): 1107~1110(1993)

Kohama Y, Matsumoto S, Mimura T, Tanabe N, Inada A, Nakanishi T. Isolation and identification of hypertensive principles in red-mold rice. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*. **35**(6) : 2484~2489(1987).

Lee R., Lu M., and Gillies L. : Antihypertensive effects of perindopril treatment in adult spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Cardiol.*, **13**(9), 831~835(1997)

Linz W., Wiemer G. and Schaper J. : Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, left ventricular hypertrophy and fibrosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **147**, 89~97(1995)

Matusmura Y, Kita S, Tanida Y, Taguchi Y, Morimoto S, Akimoto K, Tanaka T :
Antihypertensive effect of sesamin. III. Protection against development and
maintenance of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.
Biol. Pharm. Bull. 21(5), 469-473 (1998)

Ogawa H, Sasagawa S, Murakami T, Yoshizumi H : Sesame lignans modulate
cholesterol metabolism in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 22(Suppl 1), S310-S312(1995)

Sagesaka-Mitane Y, Sugiura T, Miwa Y, Yamaguchi K, Kyuki K. [Effect of
tea-leaf saponin on blood pressure of spontaneously hypertensive rats].
Yakugaku Zasshi : 116(5) : 388~395(1996)

Saito Y, Wanezaki, K, Kawato A, Imayasu S. Antihypertensive effects of
peptide in sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats.
Biosci Biotechnol Biochem : 58(5) : 812~816(1994)

Shoentan A., Auguisti K. T., and Joseph P. K. : Hypolipidemic effects of
garlic oil in rats fed ethanol and high lipid diet. *Experientia*, 40, 261~
263(1984)

Singer P, Moritz V, With M, Berger I, Forster D. Blood pressure and serum
lipids from SHR after diets supplemented with evening primrose, sunflowerseed
or fish oil. *Prostagandins Lenkot Essent Follty Acids*. 40(1):17~20(1990).

Sjoblom L, Eklund A, Ostlund-Lindqvist AM, Jonsson L. Effects of diet and

metoprolol on lipid levels in the blood plasma and morphology of the heart and intramural branches of coronary arteries of spontaneously hypertensive male rats. A 9-month study. *Ann Nutr Metab* : 33(5)284~296(1989).

Sugano M, Ikeda I, Wakamatsu K, Oka T : Influence of Korean Pine (*Pinus Koraiensis*)-seed oil containing cis-5, cis-9, cis-12-octadecatrienoic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism, eicosanoid production and blood pressure of rats. *Br J Nutr* 72(2): 775 ~783(1994)

Yamaguchi M. and Yearul K.A. : Effect of shiitake and maitake mushroom on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. vitaminol.*,33, 341 (1987)

Zhang CY, Tan BK. Hypertensive activity of aqueous extract of *Andrographis paniculata* in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23(8) : 675~678(1996)

Zhang TX, Wang YF, Ciriello J. The herbal medicine tian ma gou teng yen alters the development of high blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. *Am J Chin Med* 17(3-4) : 211~219(1989)

강정애, 강정숙: 고 또는 저콜레스테롤 식이를 먹인 쥐에 있어서 양파, 마늘이 체내 콜레스테롤과 중성지방 수준 및 혈소판 응집에 미치는 영향. *한국영양학회지*, 30(2), 132~138(1997)

김군자, 김한수, 정승용: 고콜레스테롤혈증 유발 흰쥐에 있어서 버섯류가 지질성분에 미치는 영향. *한국영양식량학회지*, 21(2), 131~135(1992)

우근린, 이상섭, 우병설, 김병각, 김낙두: 한국산 생약의 혈압강하성분에 관한 연구. 과학기술처 연구보고서(1973)

윤진숙, 박정아, 김윤년: 혈압조절에 있어서 Renin 활동도의 차이와 Ca, Na섭취 습관 그리고 호르몬 간의 관련성, 한국영양학회지, 30(2), 170~176(1997)

전희정, 백재은: 처리법을 달리한 마늘 첨가 식이가 자발성 고혈압 쥐의 혈액에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지, 6~26(1), 103~108(1997)

정명현, 박정완: 혈압강하제 국산자원 생약의 혈압강하 성분에 관한 연구 (III): 한국산 두충의 가토 혈압에 미치는 영향. 생약학회지 6(1), 39, 1975

제3장 치매의 예방을 위한 소재의 탐색 및 평가

제 1 절 서론

노령 인구의 증가는 노화와 관련된 노인성 치매(senile dementia)치료에 대한 문제를 심화시키고 있다. 이 질환은 높은 발병률 및 현재 뚜렷한 치료제 및 예방제가 없는 점으로 인하여 막대한 사회경제적인 손실을 유발하고 있다. 본 연구에서는 노인성 치매의 병인론에 대한 최근의 지견에 기초한 검색 모델을 이용하여 이에 대한 천연물의 효과를 검색하여 이 질환에 대한 예방적 기능을 가지는 기능성 식품 후보물질을 확보하고자 하였다.

알츠하이머 병에서는 신경세포의 지속적인 파괴에 대한 베타 아밀로이드 가설 (Glenner and Wong, 1984; Masters *et al.*, 1985; Wong *et al.*, 1985, Selkoe *et al.*, 1986; Cotman and Pike, 1994)이 점점 설득력을 더하고 있다(Fraser *et al.*, 1997; Selkoe, 1997). 즉, 가족형 알츠하이머병을 유발하는 apoE4 polymorphism, presenilin 1 mutations, presenilin 2 mutations 등이 모두 뇌속에 베타 아밀로이드 단백질의 생산 및 축적을 증가시키는 것으로 알려져 있으며(Selkoe, 1997), 최근에는 베타 아밀로이드를 포함한 amyloid 전구단백(amyloid precursor protein)의 carboxyl-terminal 부분의 아미노산 105개로 이루어진 재조합 carboxyl-terminal 105-amino-acid fragment (CT105)의 신경독성이 보고(Fraser *et al.*, 1996; Kim and Suh, 1996)되어 베타아밀로이드 가설을 더 한층 지지하고 있다.

알츠하이머 병의 원인에 대하여 베타 아밀로이드 가설과 더불어 주목받는 염증(inflammation) 가설이 점점 그 설득력을 더하고 있다. 지금까지의 알츠하이머 병의 연구에서는 신경세포에 초점이 맞추어졌으나, 최근 수 년간의 연구결과에 의하면, 성상세포(astrocyte) 및 microglia가 알츠하이머 병의 신경퇴행에 있어서 중요한 역할을 할 것임을 시사하는 실험적 증거들이 축적되고 있다(McGeer and McGeer, 1995). 한편, 뇌의 microglia는 뇌조직의 염증성 반응에 있어서 중추적인 역할을 담

당한다(McGeer and McGeer, 1995). 최근 몇몇 연구보고들은 베타 아밀로이드 단백질이 microglia를 직접적으로 자극한 다는 증거들을 제시하고 있다. 즉, microglia로부터의 반응성 질소대사물과 TNF- α 의 생산이 베타 아밀로이드 단백질과 interferon- γ 를 동시에 투여시 상승적으로 증가됨이 보고되었다(Goodwin *et al.*, 1995; Meda *et al.*, 1995). 또한 human A β 1-40 및 A β 1-42에 의한 microglia의 활성화가 신경세포의 괴사를 유발할 수 있음이 최근에 세포배양상에서 제시된 바 있다(Giulian *et al.*, 1996). 따라서 알츠하이머 병의 pathogenesis에 있어서 중요한 역할을 하는 베타 아밀로이드, 염증반응, 반응성 산소 라디칼(reactive oxygen radical)을 억제할 수 있는 천연물 자원을 도출하고자 하였다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1) 검색대상 시료의 표준분획 제조

검색대상 시료로서 작약, 길경, 당귀, 황기등을 포함한 수십여종을 선정하여 80% methanol을 가하여 표준 extract를 제조하였고, 각각의 검색 모델에서 유의성 있는 결과를 보이는 천연물의 유효성분을 구명하기 위하여, 수용성 및 지용성의 정도에 따라 분획을 만들었다. 즉, 시료를 평량한 후 80% methanol을 가하여 3 시간 동안 reflux 시켜 추출하고 여과하였다(여액 A). 잔사에 다시 80% methanol을 가하여 3 시간 동안 reflux 시켜 추출하고 여과한 여액 B를 여액 A와 합하였다(1). Methanol 대신 증류수를 사용하여 위와 동일 방법으로 표준엑스를 제조하여 이를 또한 검색용 표준엑스로 사용하였다(2). 이를 감압 건조하여 농축시키고 이를 검색용 표준으로 사용하였다. 이를 각종 유기용매의 극성을 높여 나가는 방법으로 단계적으로 추출하여 n-hexane extract, CH₂Cl₂ extract, EtOAc extract, 그리고 n-BuOH extract를 각각 얻어 사용하였다. 즉 상기 (1)과 (2)의 표준엑스를 평량하고 중량의 20배의 증류수와 동량의 CH₂Cl₂를 가하고 분획여두를 사용하여 진탕방치하였다. 상

층(물층)에 다시 CH_2Cl_2 를 가하고 진탕방치하여 상층은 물분획으로 감압농축, 냉동 건조하여 물분획으로 하고, 하층은 첫단계의 하층과 합하여 CH_2Cl_2 존재하의 진탕방치를 3회 이상 반복하여 CH_2Cl_2 분획으로 농축하여 검색시료로 사용하였다.

2) 신경세포 일차배양(primary culture)

Mixed cortical cell(neuronal 과 glial elements를 포함, glia는 생후 1-3일 된 마우스를 사용하여 3-6주간 배양후 mixed cortical culture에 사용)의 배양은 임신 14-16일된 마우스로부터 얻었다 (Choi *et al.*, 1987). mixed cortical cell은 24 well plates(Falcon Primaria #3847)에 미리 준비된 glia 배양세포위에 plate하였다. 배양세포는 37도의 humidified CO_2 배양기에서 유지시켰다. 5-7일 후 $10 \mu\text{M}$ cytosine arabinoside에 1-3일간 배양세포를 노출시켜 nonneuronal cell division (특히 microglia)을 억제한 후 15-20 days in vitro(DIV)에 cortical culture가 성숙하였을 때 실험에 사용하였다.

3) 신경세포의 손상측정

신경세포 손상은 lactate dehydrogenase(LDH) 및 MTT(Mitochondria toxicity test)를 측정하는데 LDH는 손상 및 파괴된 세포로부터 release된 LDH를 실험 후 24 시간 뒤 세포외액을 채취하여 측정하였다. 이 방법에 대하여는 이미 이전에 hypoxia에 의한 LDH efflux 가 손상 및 파괴된 신경세포 수와 비례하여 일치하였음을 보고하였다(Koh and Choi, 1987). 신경세포 손상은 역시 100x 와 200x 배율에서 phase-contrast microscopy로 검사하여 확인하였다.

또한 MTT는 stock 용액(5 mg/ml)을 배양신경세포에 최종농도를 1mg/ml 되게 넣은 다음 섭씨37도에서 2 시간 배양하였다. 추출완충액을 넣어 formozan grain을 용해시킨 다음 섭씨 37도에서 20시간 배양한 후 570nm에서 O.D.를 측정하였다. 이 방법은 신경세포의 호흡독성을 평가하게되며 신경세포의 손상에 대한 변화를 LDH보다 초기에 예견할 수가 있다.

4) 생화학적 검색

백서의 brain homogenate를 각 두군으로 나누어 한 군은 생약 추출물을 처리하고 다른 한 군은 생약추출물을 처리하지 않고서 모두 NADPH/ADP/Fe generating system으로 산화를 유발한후 항산화 정도를 군별로 비교하였다. 즉, 20mM HEPES + 140mM KCl(pH 7.4) buffer로 만든 brain homogenate와 몇가지 농도 별 생약재 추출물을 37 °C 에서 15, 30, 45, 60분 시간별로 반응시킨후 NADPH/ADP/Fe로 산화를 유발한 후 TBA solution을 가해 반응을 정지 시켜 brain homogenate로부터 생성된 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)을 정량적으로 측정함으로써 생약추출물의 반응시간 별, 또는 농도별 항산화 활성유무를 확인하였다. 이 실험으로부터 항산화력이 우수한 것으로 인정된 생약 추출물은 다시 농도별로 효능검정을 실시하여 최대 유효농도를 결정하였다.

5) 뇌실내 주사

뇌실내 주사는 Laursen & Belknap의 방법으로 시행하였다(참조: Laursen & Belknap, J. Pharmacol. Methods. 16, 355, 1986). 두정(bregma)에 50 µl Hamilton 주사기에 26 gauge 주사바늘을 꼽고, 주사끝 2.4 mm를 삽입하여 5 µl를 주사하였다.

6) 뇌실내 H₂O₂ 및 xanthine oxidase 투여로 인한 사망에 있어서 천연물 투여의 차단작용

생쥐에 당귀등의 천연물 추출액을 1-3 g/kg의 용량으로 경구로 투여한 다음 1 시간 후, 5% H₂O₂ 5 µl 혹은, xanthine oxidase (15%) 5 µl를 뇌실내로 주입하고 사망시간이 투여된 천연물에 의해 지연되는지를 측정하였다.

7) 수동회피 반응 검사.

알츠하이머병의 원인물질로 알려진 Aβ₁₋₄₂ 1.85 µg을 뇌실내로 투여하고, 1

일후에 one-trial step-through 수동회피 반응을 검사하였다. 수동회피검사는 다음과 같이 시행하였다(Song 등, 1998). 수동회피상자는 밝게 조명된 방과 어두운 방으로 이루어져 있으며, 바닥에는 전기충격을 줄 수 있도록 장치하였다. 훈련시(training trial)에는 생쥐를 밝은 방에 놓을 때, 생쥐가 어두운 방으로 들어가는 즉시 전기충격을 가한다(0.25 mA, 1 s). 검사(testing trial)는 당귀 투여 시작 후 8일 및 17일에 두 번에 걸쳐서 실시하였다. 즉, 생쥐를 밝은 방에 놓고, 어두운 방으로 들어가지까지의 시간을 측정하였다(최대제한 시간 300초).

8) LPS 투여로 인한 사망에 대한 차단작용

Lipopolysaccharide(LPS, 40 µg/kg, i.p.) 및 D-galactosamine(800 mg/kg, i.p.) 주사하면, 대식세포에서 TNF-α가 분비되어 간손상 및 치사를 유발한다. 따라서 LPS 및 D-galactosamine 주사로 인한 치사율에 대한 생약성분의 억제활성 검색을 시행하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1) 알츠하이머 병의 *in vitro* 모델의 확립

일차 신경세포배양상에서 베타 아밀로이드 독성 유발 모델을 확립하고 이에 대하여 상기 천연물의 표준 extract의 베타 아밀로이드 차단 활성을 검색하였다. 39 종의 천연물에 대하여 검색한 결과, 천연물 extract 100 µg/ml의 농도에서 베타 아밀로이드의 독성을 80%이상 차단하는 2 종(곽향, 인진호)과 50-79% 차단하는 2종(유근피, 차전자)의 천연물을 검출하였다.

표 1. 일차 신경세포 배양상에서 β -amyloid 독성에 대한 천연물의 표준 extract의 보호작용

Sample	Death(%)
β -amyloid control	100
각향	16
유근피	47
차전자	38
삼초썩	55
인삼	342
황정	93
마란자종	325
마란자피	89
천마	55
맥문동	110
당귀	111
만형자	616
백지	121
백출	139
작약	490
지실	113
진피	172
천근	657
토천궁	112
팔각회향	255
택사	109
합환피	302
현삼	101
황련	517
엄나무	81

-continued-

Sample	Death(%)
후박	59
승마	72
오약	66
단삼	65
삼능	80
만삼	76
연	145
천남성	54
호프	77
오수유	411
대나무잎	100
현호색	78
원지	105
인진호	18

2) 노인성 치매의 병인과 연관된 유해 활성산소제작용 검색

노인성 치매의 병인에 밀접하게 연관된 유해 활성산소(ROS: reactive oxygen species) 억제작용 검색으로서 *in vitro* 및 *in vivo* 검색법을 확립하고 활성 검색을 시행하였다.

a) *in vitro* 검색법으로는 brain homogenate로부터 NADPH/ADP/Fe generating system에서 malondialdehyde(MDA)의 생성억제 활성을 측정하였으며, 19 종의 천연물에 대해 검색한 결과, 대조군(추출물 무처리군)에 비해 실험군(추출물 처리군)이 100 ug/ml의 농도에서 50-79%의 항산화 활성을 보인 천연추출물 4종(마란자종, 합환피, 세신, 황련)을 검출하였다.

표 2. Brain homogenate로부터 NADPH/ADP/Fe generating system에서 malondialdehyde(MDA)의 생성에 대한 천연물의 표준 extract의 억제작용

Sample	nmol MDA/ml brain homogenate/min(%)
Control	100
차전자	81
삼초썩	88
황정	95
마란자종	42
천마	99
맥문동	99
당귀	98
만형자	100
백지	98
백출	100
작약	78
지실	90
진피	97
팔각회향	80
택사	99
합환피	24
현삼	87
황련	20
세신	33

b) *in vivo* 검색법으로는 검색 대상 천연 추출물을 2 g/kg의 용량으로 경구로 투여 한 다음, 일정량의 H₂O₂ (15%)의 뇌실내 주사시(5 μ l)의 생존시간 연장효과를 검색하는 것으로서 29 종의 천연물에 대해 검색한 결과, 대조군(추출물 무처리군)에 비해 실험군(추출물 처리군)이 2종(천궁, 정향)에서 상당한 생존 시간 연장 효과를 관찰하였다.

표 3. H₂O₂ (15%)의 뇌실내 주사시(5 μ l) 생쥐의 생존시간에 대한 천연물의 표준 extract의 연장효과

Sample	생존기간 (초)
control	98
방기	101
계지	97
원지	77
작약	101
산약	96
현호색	101
맥문동	88
천마	104
대나무잎	117
연교	99
금은화	109
원방풍	105
지모	92
부평초	127
목향	112
형개	126
황련	89
공사인	76
치자	103
가구자	94
하수오	101
지각	125
정향	146
양강	120
천궁	131
상백피	119
과루인	110
토도인	115
수황기	110

3) 노인성 치매의 질환모델의 확립

베타 아밀로이드의 *in vivo* 독성 유발 모델을 확립하고 이에 대하여 상기 천연물의 표준 extract의 베타 아밀로이드 차단 활성 검색을 진행하였다. 베타 아밀로이드를 뇌실내로 투여하고 2 일후에 수동회피 반응을 검사한 결과, 베타 아밀로이드가 투여된 쥐는 현저한 escape latency의 감소를 보였다 (Fig. 1). 여러 천연물자원의 효과를 검색한 결과, 항산화 활성이 있는 것으로 알려진 들깨박 (Fig. 2) 및 금은화 (Fig. 3), 토천궁 (Fig. 4), 파고지 (Fig. 5), 인삼 (Fig. 6)은 유의한 효과를 나타내지 못하였다. 그러나 당귀는 0.25 및 0.5 g/kg의 용량에서 유의한 작용을 보였으며 (Fig. 7A), 핵산층 및 부탄올층에서 유의한 효과를 나타내었다 (Fig. 7B). 한편, 당귀 0.1 g/kg의 용량을 8일 동안 투여한 경우, 유효한 경향을 보였으며 (Fig. 8A), 이들 생쥐에게 추가로 9일 동안 더 투여한 경우, 통계적으로 거의 유의한 작용을 나타내었다 (Fig. 8B). 또한 당귀 0.1 g/kg의 용량을 1, 2, 4 주 동안 투여한 경우, 투여한 기간에 의존적으로 유효한 경향을 보였으며, 4 주 동안 투여한 군에서는 유의한 보호 효과를 나타내었다 (Fig. 9). 한편, 당귀추출액의 투여는 생쥐의 체중에는 아무 영향이 없었다 (Fig. 10).

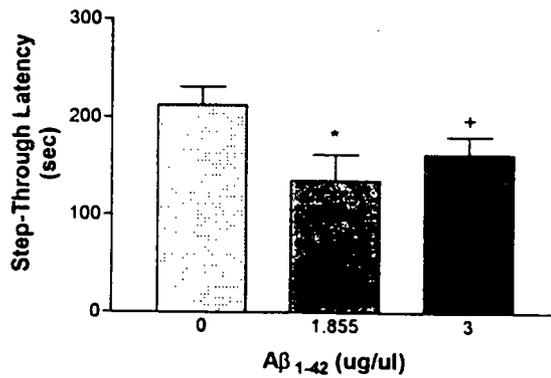
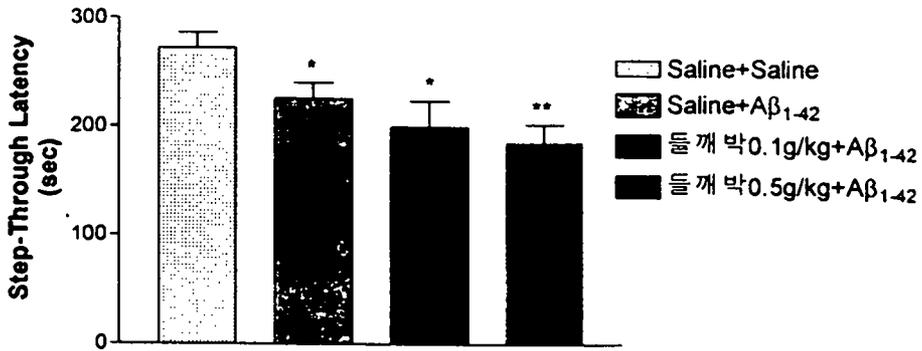


Fig. 1. Aβ₁₋₄₂을 mouse에 intracerebroventricular(i.c.v) injection하였다. saline, Aβ₁₋₄₂(1.855, 3ug/mouse)을 i.c.v injection하고 1일 후에 passive avoidance task training하고 i.c.v injection 2일 후에 test를 실시하였다. 결과 1.855ug-group이 3ug-group보다 Step-through latency가 더욱 유의하게 감소함을 관찰할 수 있다(n=10, * p<0.05, + p<0.06).

A



B

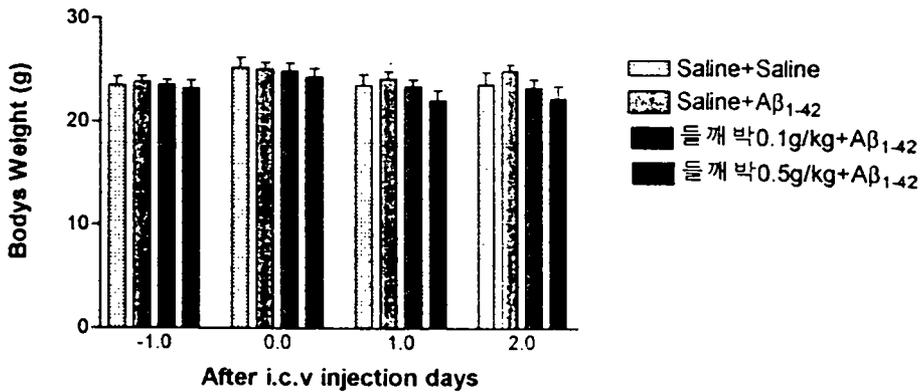


Fig. 2. Mice에 들깨박 추출물을 1일2회 0.1g/kg, 0.5g/kg용량으로 경구 투여하고 A β_{1-42} 는 1.855ug/mouse i.c.v injection하였다. i.c.v injection하기 전에 들깨박 추출물을 1일(2차) 투여하고 i.c.v injection한 후에 2일(3차) 투여하였다. (A) 들깨박 추출물은 A β_{1-42} 에 의한 step-through latency 감소에 억제작용을 나타내지 않았다(n=10, * p<0.05, ** P<0.01). (B) passive avoidance test 기간중 mice의 weight는 유의한 변화를 보이지 않았다.

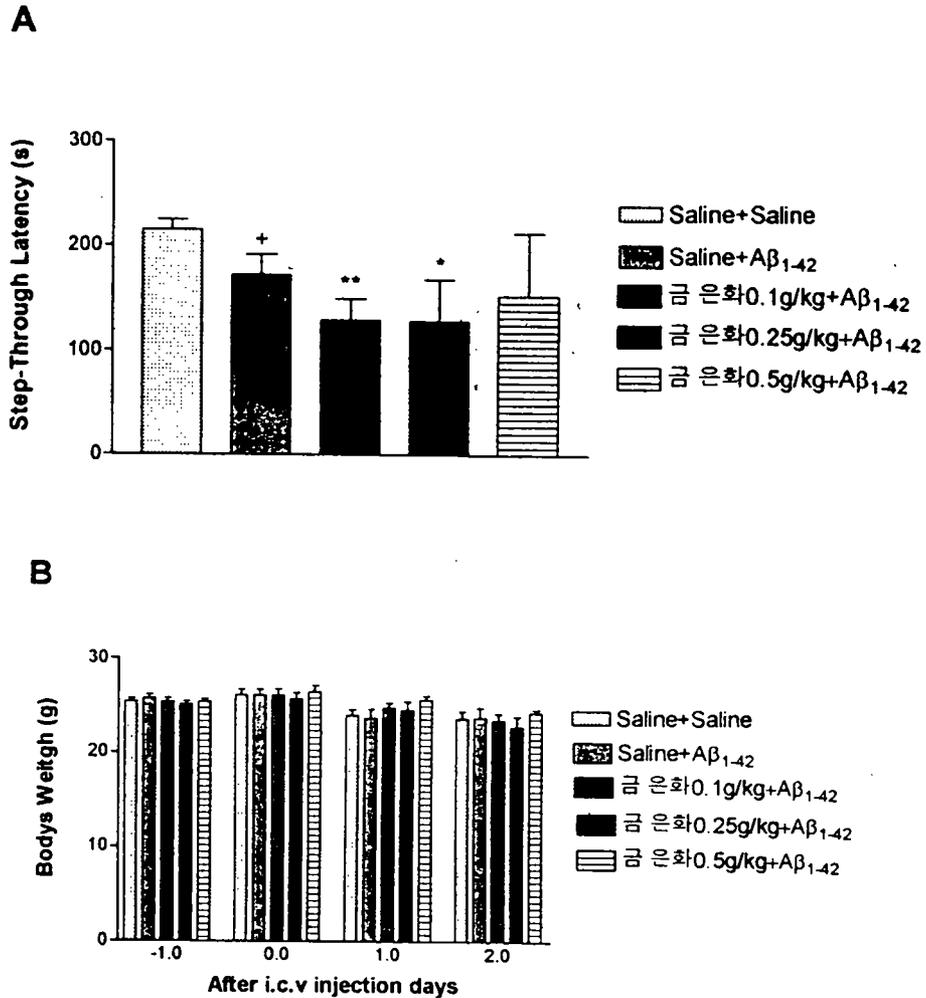


Fig. 3. Mice에 금은화 추출물을 1일2회 0.1g/kg, 0.25g/kg, 0.5g/kg 용량으로 경구 투여하고 Aβ₁₋₄₂는 1.855ug/mouse i.c.v injection하였다. i.c.v injection하기 전에 금은화 추출물을 1일(2차) 투여하고 i.c.v injection한 후에 2일(3차) 투여하였다. (A) 금은화 추출물은 Aβ₁₋₄₂에 의한 step-through latency 감소에 억제작용을 나타내지 않았다(n=10, * p<0.05, ** P<0.01). (B) passive avoidance test 기간중 mice의 weight는 유의한 변화를 보이지 않았다.

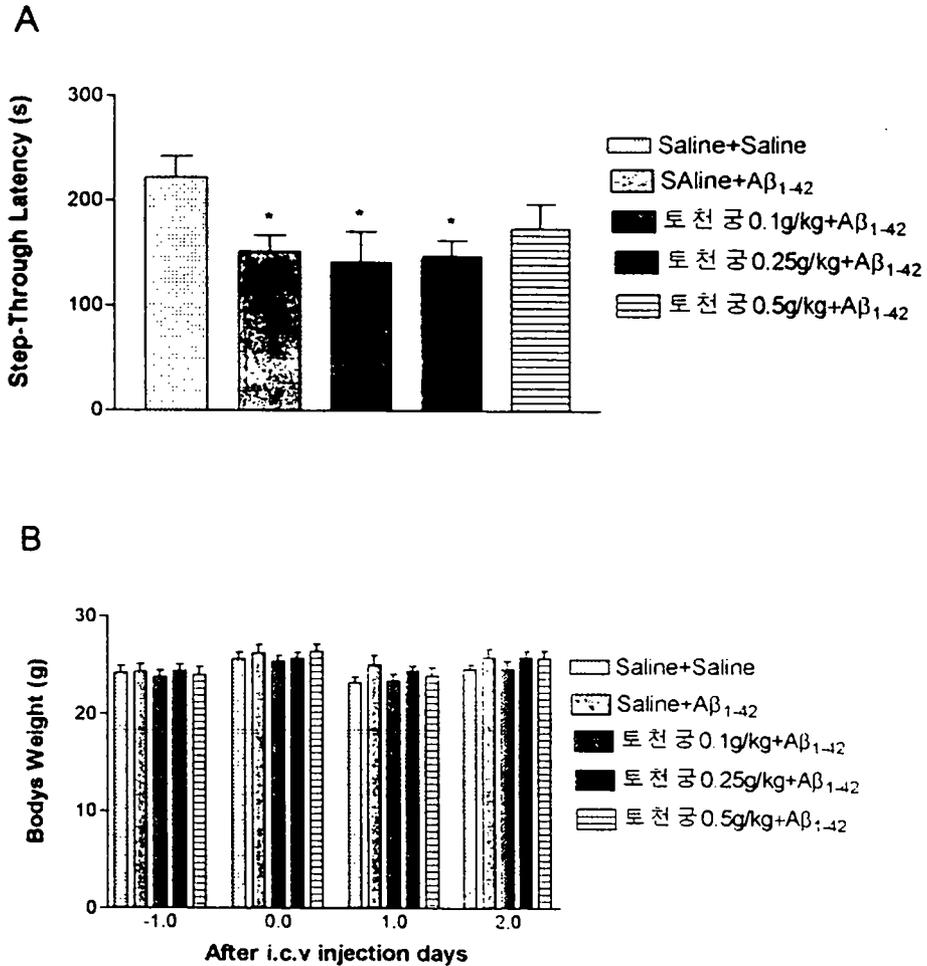


Fig. 4. Mice에 토천궁 추출물을 1일2회 0.1g/kg, 0.25g/kg, 0.5g/kg용량으로 경구 투여하고 Aβ₁₋₄₂는 1.855ug/mouse i.c.v injection하였다. i.c.v injection하기 전에 토천궁 추출물을 1일(2차) 투여하고 i.c.v injection한 후에 2일(3차) 투여하였다. (A) 토천궁 추출물은 Aβ₁₋₄₂에 의한 step-through latency 감소에 억제작용을 나타내지 않았다(n=10, * p<0.05). (A) Passive avoidance test 기간중 mice의 weight는 유의한 변화를 보이지 않았다.

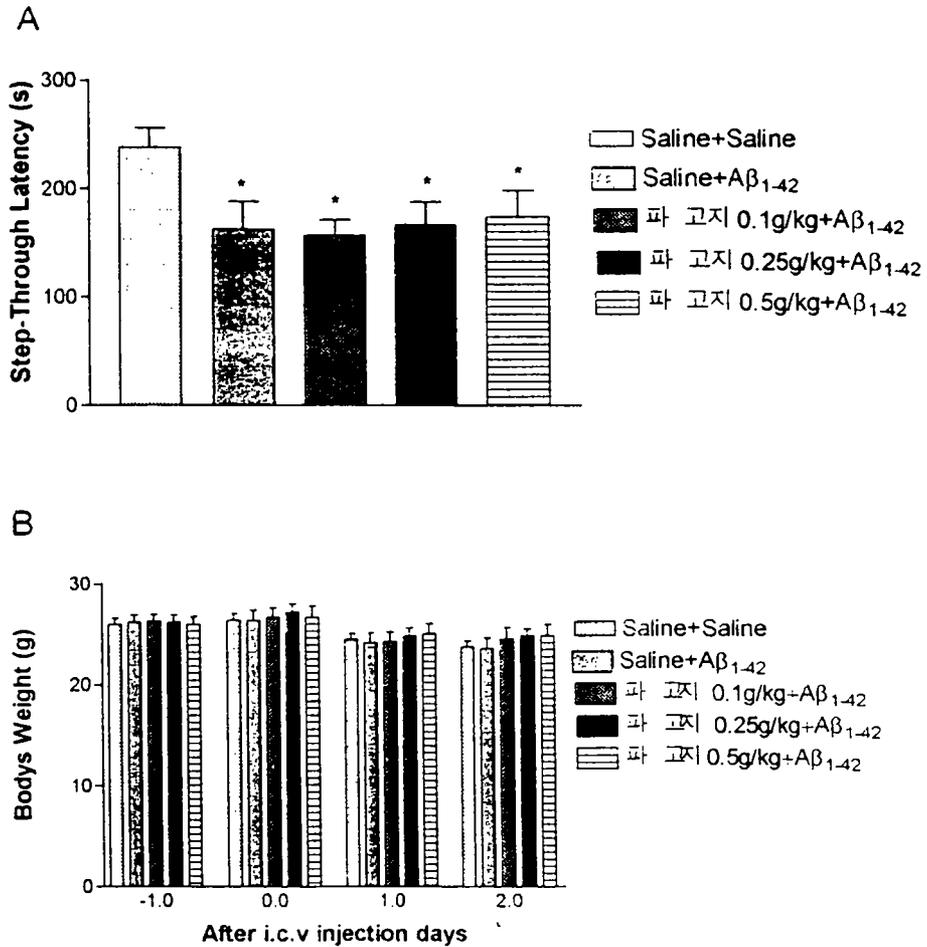
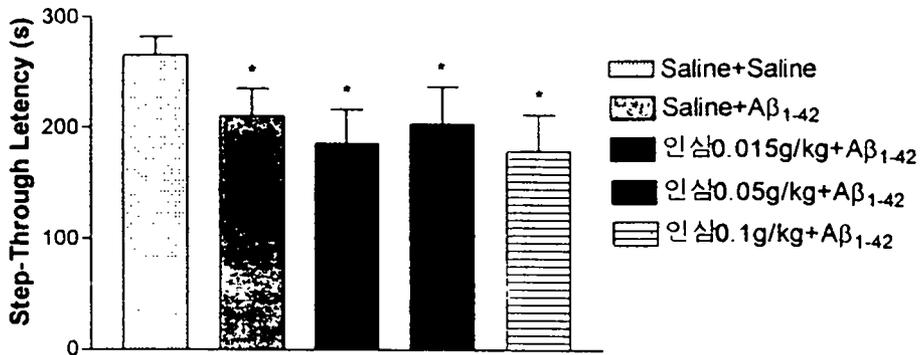


Fig. 5. Mice에 파고지 추출물을 1일2회 0.1g/kg, 0.25g/kg, 0.5g/kg용량으로 경구 투여하고 Aβ₁₋₄₂는 1.855ug/mouse i.c.v injection하였다. i.c.v injection하기 전에 파고지 추출물을 1일(2차) 투여하고 i.c.v injection한 후에 2일(3차) 투여하였다. (A) 파고지 추출물은 Aβ₁₋₄₂에 의한 step-through latency 감소에 억제작용을 나타내지 않았다(n=10, * p < 0.05) (B) Passive avoidance test 기간중 mice의 weight는 유의한 변화가 보이지 않았다.

A



B

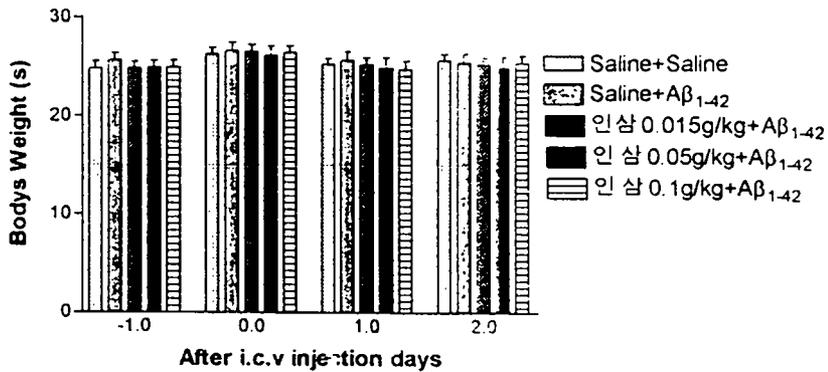
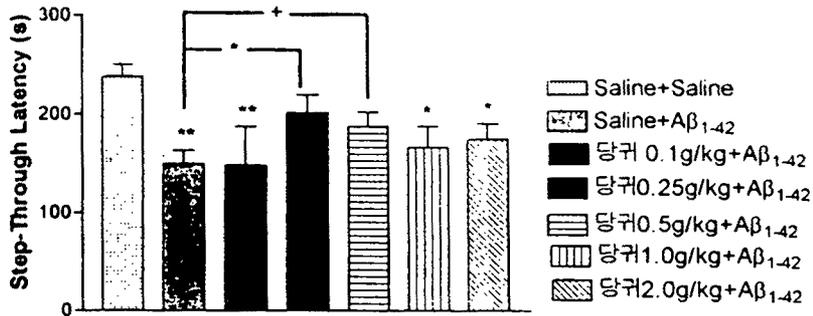


Fig. 6. Mice에 인삼-사포닌을 1일2회 0.01g/kg, 0.05g/kg, 0.1g/kg 용량으로 경구 투여하고 Aβ₁₋₄₂는 1.855ug/mouse i.c.v injection하였다. i.c.v injection하기 전에 인삼-사포닌을 1일(2차) 투여하고 i.c.v injection한 후에 2일(3차) 투여하였다. (A) 인삼-사포닌은 Aβ₁₋₄₂에 의한 step-through latency 감소에 억제작용을 나타내지 않았다 n=10, * p<0.05). (B) Passive avoidance test 기간중 mice의 weight는 유의한 변화를 보이지 않았다.

A



B

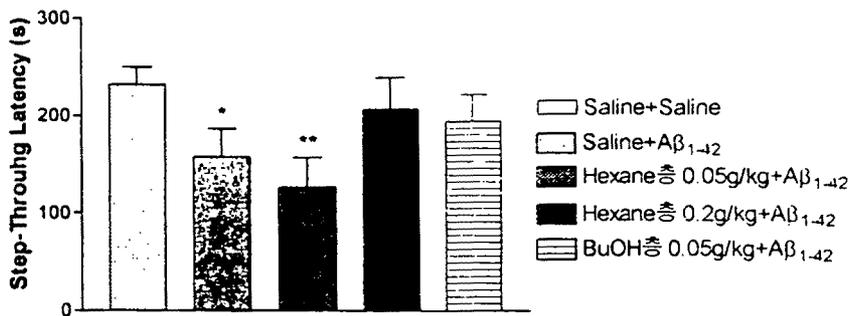
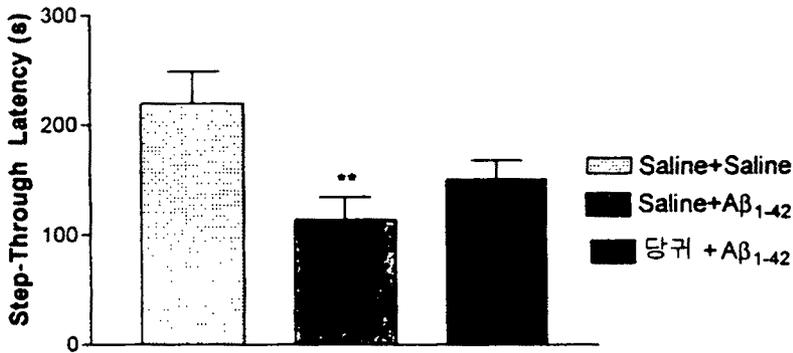


Fig. 7. (A) Mice에 당귀 추출물을 1일2회 0.1g/kg, 0.25g/kg, 0.5g/kg, 1.0g/kg, 2.0g/kg 용량으로 경구 투여하고 Aβ₁₋₄₂는 1.855ug/mouse i.c.v injection하였다. i.c.v injection하기 전에 당귀 추출물을 1일(2차) 투여하고 i.c.v injection한 후에 2일(3차) 투여하였다. 당귀 추출물을 0.1g/kg, 1.0g/kg, 2.0g/kg 투여한 group에서는 Aβ₁₋₄₂에 의한 step-through latency 감소에 억제작용을 나타내지 않았으나 0.25g/kg, 0.5g/kg 투여한 group에서는 유의하게 억제작용을 나타냈다. (B) 당귀분획-Hexane(0.05g/kg, 0.2g/kg), BuOH(0.05g/kg) 층을 위와 같은 조건에서 측정된 결과 Hexane 0.2g/kg, BuOH을 투여한 group에서 Aβ₁₋₄₂에 의한 step-through latency 감소에 억제작용의 경향은 있지만 유의성은 나타내지 않았다(* p<0.05, ** p<0.01, + p<0.07).

A



B

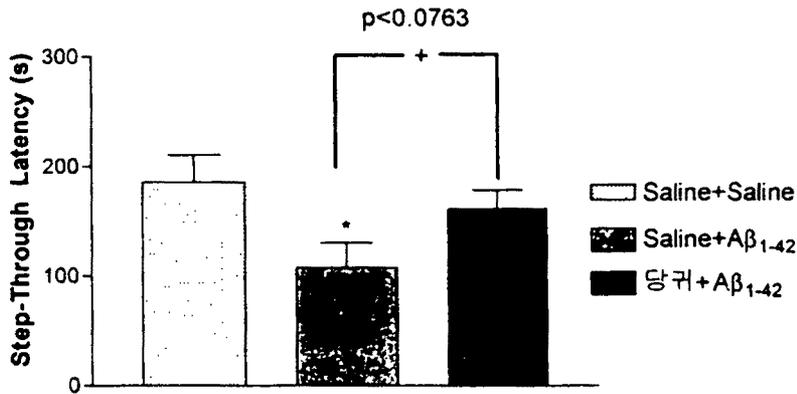


Fig. 8. (A) Mice에 당귀 추출액을 1일 1회 0.1g/kg의 용량으로 8일 동안 경구 투여하고 Aβ₁₋₄₂를 1.855ug/mouse i.c.v injection하였다. Passive avoidance test결과 당귀 추출액을 투여한 group에서 step-through latency의 감소를 억제하였다. (B) 상기의 mice에 계속하여 당귀 추출액을 9일 동안 더 투여하고 passive avoidance test결과 더욱 유의하게 Aβ₁₋₄₂에 의한 step-through latency 감소를 억제하였다(n=10, * P<0.05, ** P<0.01).

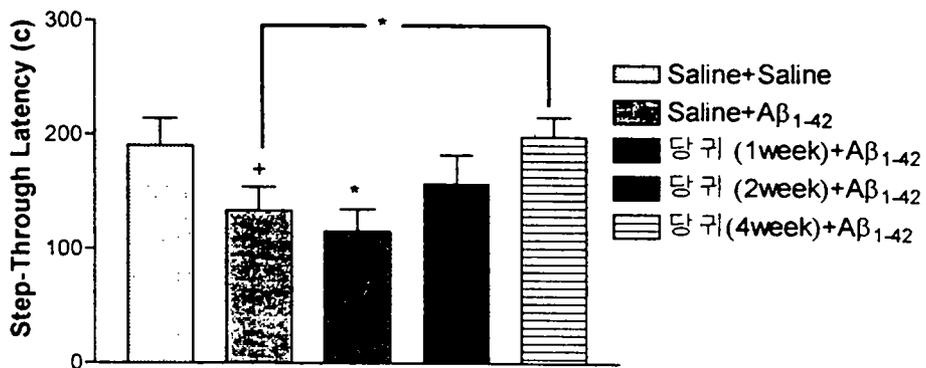
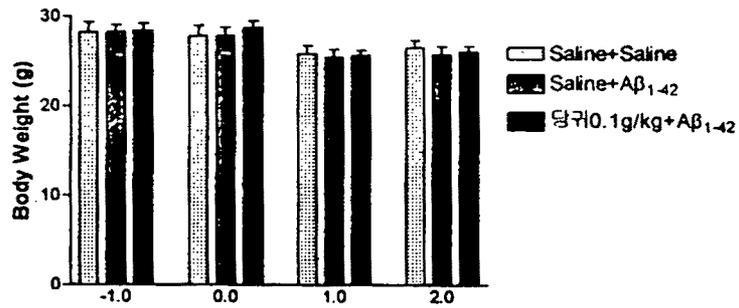
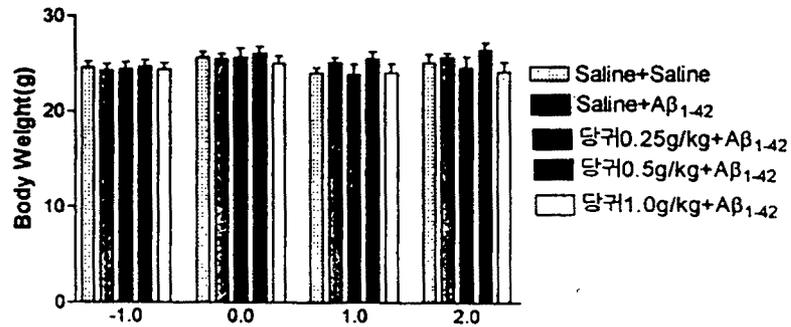


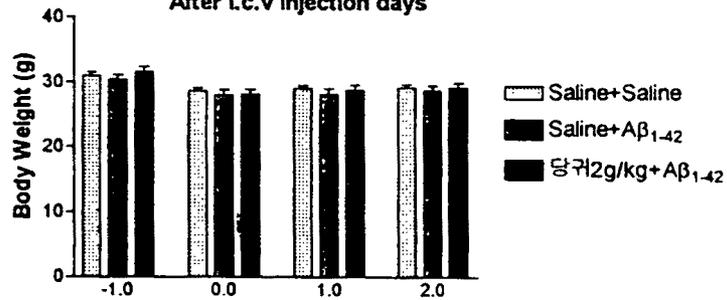
Fig. 9. Mice에 당귀 추출액을 1일 1회 0.1g/kg의 용량으로 1주일, 2주일, 4주일동안 경구로 투여하고 Aβ₁₋₄₂를 1.855ug/mouse i.c.v injection하고 passive avoidance test를 시행하였다. 결과 2주일 투여한 group에서 Aβ₁₋₄₂에 의한 step-through latency감소에 억제경향을 나타내면서 4주일 투여한 group에서는 아주 유의하게 억제작용을 나타냈다(n=10, + P<0.078, * P<0.05).



After i.c.v injection days



After i.c.v injection days



After i.c.v injection days

Fig. 10. Mice에 당귀 추출물을 1일2회 0.1g/kg, 0.25g/kg 0.5g/kg, 1.0g/kg, 2.0g/kg의 용량으로 경구 투여하고 Aβ1-42는 1.855ug/mouse i.c.v injection 하였다. Passive avoidance test 시행중 mice의 weight는 유의한 변화를 보이지 않았다.

4) 노인성 치매의 병인에 밀접하게 연관된 항염작용 검색

노인성 치매의 병인에 밀접하게 연관된 항염작용 검색으로서 *in vivo* 검색법을 확립하고 당귀의 항염 활성 검색을 진행하였다. 노인성 치매는 cytokine에 의한 염증성 질환으로 이해되고 있으며, 이들 염증성 cytokine의 작용에 대한 차단활성을 검색할 수 있는 모델로서 galactosamine을 전처치 한 쥐에서 내독소 (lipopolysaccharide, LPS)에 의한 사망 억제 작용을 조사하였다.

표 4. 당귀분획의 항염작용(LPS 및 galactosamine에 의한 치사율에 대한 보호작용)

Sample	생존마리/전체 마리	생존한 생쥐의 체온 사망시간
Saline	2/5	35.5 ± 2
methanol(1g/kg, p.o.)	1/5	
hexane (1g/kg, p.o.)	2/5	
중간층 (1g/kg, p.o.)	4/5	37 ± 0.24
EtoAc (1g/kg, p.o.)	4/5	36.5 ± 0.5
Buthanol (1g/kg, p.o.)	4/5	37.4 ± 0.4 (가장 늦게 사망)

표 4에서와 같이 buthanol 층이 가장 active였으며, 따라서 당귀의 항염작용은 buthanol층에 존재하는 것으로 판단된다. 다음, 당귀의 buthanol 분획을 다시 소분획하여, 각 소분획을 200 mg/kg의 용량으로 경구투여시에 LPS 및 galactosamine에 의한 치사율에 대한 보호작용의 실험결과는 표 5와 같다.

표 5. 당귀소분획의 항염작용(LPS 및 galactosamine에 의한 치사율에 대한 보호작용)

생존마리/전체마리	생존한 생쥐	체온
Saline 2/5	4/10	37.1 ± 0.54
AB1 3/5	3/5	
AB2 2/5	2/5	
AB3 5/5	8/10	37.41 ± 0.25
AB4 3/5	3/5	
AB5 2/5	2/5	
AB6 4/5	8/10	37.97 ± 0.19
AB7 2/5	2/5	
AB7-1 3/5	3/5	
AB8 4/5	9/10	37.86 ± 0.4
AB9 4/5	7/10	37.94 ± 0.51
AB10 5/5	10/10	37.81 ± 0.18

표 5에서와 같이 AB10 층이 가장 active 하고, AB8, AB6, AB3, AB9 순서로 active 하였다.

5) 노인성 치매의 병인에 유해 활성산소작용 검색

노인성 치매의 병인(pathogenesis)에 유해 활성산소(FOS: reactive oxygen species)들이 밀접하게 연관되므로 유해활성산소 억제작용 검색으로서 *in vivo* 에서의 당귀의 작용을 조사하였다.

당귀 각 분획 1 g/kg의 용량으로 경구로 투여 한 다음, 일정량의 xanthine oxidase (15%)의 뇌실내 주사시(5 μ l)에 의한 사망 억제효과를 검색하는 것으로서, 대조군(생리식염수 처리군)에 비해 일부 실험군(당귀 분획 처리군)에서 상당한 사망억제 효과를 관찰하였다.

표 6. 당귀분획의 항산화작용

Sample	생존마리/전체 마리
Saline	1/4
Hexane (1g/kg, p.o.)	4/4
중간층 (1g/kg, p.o.)	2/4
EtoAc (1g/kg, p.o.)	3/4
Buthanol (1g/kg, p.o.)	1/4

즉, 표 6에서와 같이 hexane 층이 가장 active 하였으며, 따라서 당귀의 항염작용은 buthanol층에, 항산화작용은 hexane층에 존재하는 것으로 사료되었다.

6) 당귀의 성분분석 연구

이상에서 도출된 당귀에 대한 성분분석 연구를 시행하였다.

(1) 기기 및 시약

(a) 기기: ^1H , ^{13}C -NMR 및 DEPT 135 Spectrum은 Bruker Avance 250(250MHz) spectrometer 및 Bruker ARX 300(300MHz) spectrometer를, 2D-NMR은 Bruker DMX 600(600MHz) spectrometer를 사용하여 측정하였으며, chemical shift value 는 part per million (ppm)단위로 나타내었다. Mass spectrum은 JEOL JMX-HX/110A과 VG Autospec (Micromass Co.)를 사용하여 Fab positive 또는 negative mass 방법으로 spectrum을 측정하였다.

(b) 시약: 추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였으며 기타 시약은 특급을 사용하였다. Silica gel TLC plate는 precoated Kieselgel 60F₂₅₄ (NO.5715, Merck)를, reverse phase TLC plate는 precoated RP-18F_{254s}를 사용하였다. Column chromatography용 silicagel은 Kieselgel 60 (NO.7734, 70-230mesh, Merck)을 사용하였고, Sephadex LH-20 는 Pharmacia LKB사의 제품을 구입하여 사용하였고 reverse phase column의 충전제로는 LiChroprep RP-18(particle size : 40~63 μm , Merck)를 사용하였다.

(2) 추출 및 분리 -Scheme 1-

건조된 당귀 4.2kg을 MeOH:H₂O = 9:1 (12ℓ)로 약 60 °C에서 12시간씩 환류냉각하면서 2회 추출하여 추출액을 여과 후 감압농축하여 MeOH extract 1.1kg을 얻었다. 이 MeOH extract에 증류수(1.5ℓ)를 가해 현탁시킨 후 n-hexane(1.0ℓ)을 가하여 진탕시키고 분획 깔때기로 n-hexane층과 수층으로 분획하는 조작을 2회 실시하여 얻은 n-hexane층을 감압농축하여 n-hexane extract(100.2g)를 얻었다. 계속해서 수층을 상

기와 같은 방법으로 EtOAc, BuOH순서로 추출하여 EtOAc extract 14.68g, n-BuOH extract 39.43g을 얻었고 남은 수층을 감압농축하여 H₂O extract 638.85g을 얻었다. 이들 중 BuOH extract 39.43g을 silica gel column chromatography를 실시하여 다음과 같이 분리하였다. 즉, column (길이 80cm, 지름 8cm)에 silica gel (No.9385, 230-400mesh, Merck)을 약 21cm 정도 채우고 CHCl₃ : MeOH(= 9 : 1) 1ℓ로 elution시켜 stationary phase를 포화시킨 후 시료 38.5g을 silica gel (No.7734, 70-230mesh, Merck) 약 39g에 흡착시켜 column에 loading시켰다. CHCl₃ : MeOH(= 9 : 1)로 mobile phase elution을 시작하여 연속적으로 85:15, 7:3, 6:4, 1:1, 3:7 1:9순으로 극성을 높여 elution하면서 column에 N₂ gas를 일정한 속도를 흘려 주는 flash column chromatography법으로 fraction 1~10을 분리하였다.

분리된 fraction중 fraction 3을 reverse phase (particle size:40~63μm) column (길이 55cm, 지름 2cm)에 MeOH:H₂O(=3:7) 혼합 용매로 먼저 column을 안정화시켰다. 시료 0.1403g을 MeOH, H₂O 혼합용매에 녹여 column에 loading한 후 MeOH의 비율을 단계적으로 높이며 elution시켜서 **Compound I**을 얻었다.

앞서의 fraction 중에서 fraction 5(16.2522g)는 silica gel TLC(전개 용매 CHCl₃ : MeOH : water = 8:2:0.1)상에서 Rf치가 0.40인 major spot 1개와 0.32 및 0.23인 2개의 minor spot이 관측되어 재결정을 실시하였다. 시료 중 일부(4.9688g)를 취해 MeOH 50ml를 가하여 water bath(70 ~ 80℃)상에서 용해시키고 그 용액을 실온에서 一 夜 정치하여 생성된 백색의 침전물을 여과하고 acetone으로 수회 세척한 후에 건조하여 **Compound II**를 얻었다.

한편, 상기의 fraction 중에서 fraction 8(0.7500g)도 reverse phase (particle size:40~63μm) column에서 MeOH:H₂O(=3:7)로 column을 포화시킨 후 시료를 loading하고 이후 MeOH의 비율을 점진적으로 증가시켜 fraction 1~17을 얻었고 이들 중 fraction 4는 MeOH로 포화시킨 Sephadex LH-20 column(길이 75cm, 지름 2.2cm)에 시료를 loading하여 MeOH로 elution시켜서 **Compound III**를 얻음과 동시에 fraction 10에서 **Compound IV**를 얻었다.

상기의 fraction 중에서 fraction 10(0.6045g)은 MeOH:H₂O(=3:7)로 안정화시킨 reverse phase column(길이 45cm, 지름 3.2cm)에 loading하여 MeOH:H₂O 혼합 용매를 gradient로, 단계적으로 극성을 낮추어 elution하여 Compound V를 얻었다.

앞에서 분리한 물질을 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR 및 MS 등으로 측정하여 분석 자료를 얻었다.

(3) 결과 및 고찰

Compound I의 ¹³C-NMR spectrum(fig. 12)에서 이 화합물의 전체 carbon수는 10개이고 aromatic carbon 영역에서 관측되는 4개의 peak중 157.4 및 130.7ppm의 signal이 DEPT 135 spectrum(fig. 13)에서 소실된 것으로 보아 quaternary carbon임을 알 수 있고, 128.6 및 115.4 ppm의 peak는 그 intensity로 볼 때, 각 peak는 그 화학적 환경이 같은 2개의 peak에 기인하는 4개의 carbon peak임을 알 수 있다. 이것은 전형적인 2치환 benzene핵의 pattern을 나타내고 있으며, quaternary carbon 중 157.4ppm의 peak는 downfield되는 정도로 보아서 oxygen이 결합하고 있음을 알 수가 있다.

Benzene ring의 1번 위치에 결합하고 있는 carbon의 chemical shift value가 85.1ppm로 상당히 downfield shift하고 있고, DEPT 135 spectrum에서 methylene carbon임을 알 수 있는 67.2ppm의 signal도 downfield shift되어 나타나는 것으로 보아 두 carbon 모두 oxygen에 결합된 carbon임을 알 수 있다. Ethanol의 β-위치에 결합된 methoxyl carbon을 56.2ppm에서 확인할 수 있다.

¹H-NMR spectrum(fig.11)에서 ¹³C-NMR spectrum에서 나타난 바와 같이 6.84ppm과 7.16ppm에서 각각 2개씩 화학적 환경이 등가인 4개의 proton에 해당하는 signal이 관측되어 ¹³C-NMR spectrum에서 예상된 것과 같이 para-치환 benzene임을 알 수 있다. 4.14ppm에서 나타난 signal은 benzene ring의 1번 위치에 결합된 ethanol moiety 중 β-위치의 proton이며, 3.66~3.44ppm사이에서는 α-위치의 2개의 methylene proton에 기인한 signal 및 3.21ppm에서 methoxy proton peak를 관찰할 수 있다. 그리고 benzene ring의 4번 위치에 결합된 -OH proton이 8.34ppm에 나타나 있다.

이상의 결과를 볼 때 이 화합물은 4-hydroxy- β -methoxybenzene ethanol인 것으로 생각된다.

Compound II의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum(fig. 14)의 aromatic proton 영역에서 각각 1개의 7.58(d), 7.00(s), 6.74(s) 및 6.26ppm(d)의 peak와, $^{13}\text{C-NMR}$ (fig.15) 및 DEPT 135° spectrum(fig.16)에서 aromatic carbon영역에서 112.2, 144.5, 113.0(q), 124.0, 126.0(q), 164.1(q), 97.7, 156.2(q) 및 ketone carbon에 의한 signal인 161.3ppm의 peak를 볼 때, 이 화합물은 치환되지 않은 coumarine핵을 가진 화합물로 추정된다. Carbon signal 중 164.1ppm까지 downfield shift한 것으로 보아 이웃해서 oxygen이 존재함을 알 수 있다. 한편, benzene환 옆에 furan ring이 존재할 때 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 관측되는 7~8 ppm 사이에서 관측되는 2개의 doublet peak 대신 3.23, 3.44ppm 2개의 two doublet 및 5.06ppm의 이 triplet인 1개 proton signal가 관측되므로 1치환-dihydrofurocoumarin임을 알 수 있다. 63.1ppm에서 관측되는 carbon이 DEPT 135° spectrum(fig. 16)으로부터 quaternary이며, downfield shift한 것으로 보아 이 carbon에도 oxygen이 결합되어 있고 $^1\text{H-}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum(fig.14, 15)에서 관측된 2개의 methyl group (1.41, 1.56ppm 및 21.6, 24.1ppm)이 quaternary carbon에 결합되어 있는 것으로 예상된다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 에서 4ppm부근의 당에 기인한 signal이 있고 5.1ppm에서 당의 anomeric proton이 관측되고 coupling constant가 7.7Hz로 큰 것으로 보아 당이 β 형으로 결합하고 있음을 확인하였다.

이상의 결과와 문헌치와 비교한 바, 이 화합물은 nodakenin임을 알았다.

Compound IV는 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum(fig. 18)로부터 carbon이 17개이며, 101.9ppm에 전형적인 당의 anomeric carbon signal이 보이며, 75ppm 전후로 4개의 당 peak가 관측되고, 61.8ppm에서 당의 CH_2 signal이 있는 것을 알 수 있다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum(fig. 17)의 3~4ppm 부근에서 당에 기인한 signal이 관측되고, anomeric proton에 해당하는 peak의 coupling constant가 7.7Hz로 큰 것으로 보아 당이 β 형으로 결합하고 있음을

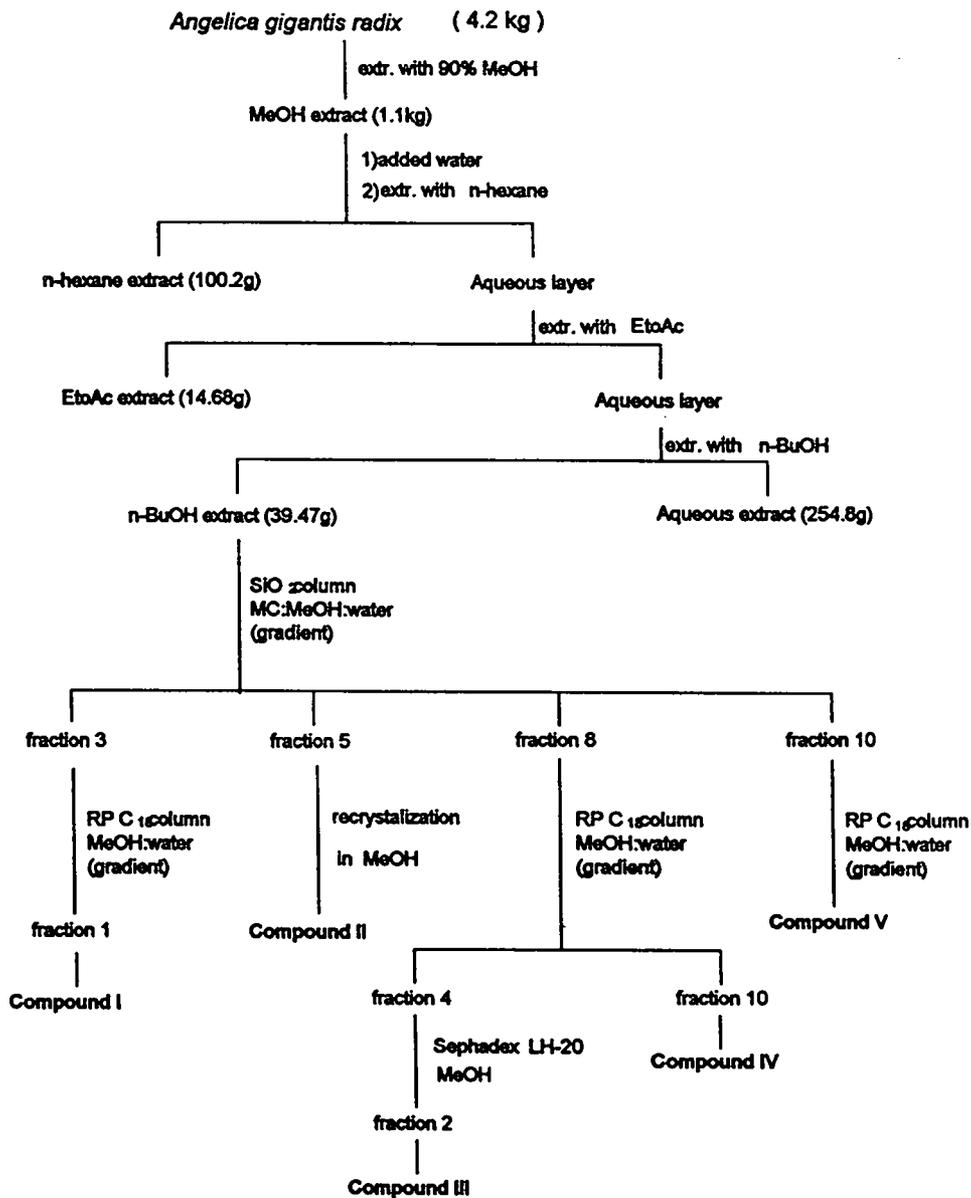
알 수 있다.

^{13}C - 및 DEPT 135° spectrum(fig. 18, 19)으로부터 12.4, 19.4 및 20.3ppm에서 methyl carbon이, 33.3 및 38.7ppm에서 methylene carbon이 관측되며 47.7과 50.0ppm에서 oxygen이 결합된 aliphatic quaternary carbon에 기인한 signal이 관측되며, 74.9와 81.9ppm의 peak가 downfield shift되어 나타나는 것으로 보아 두 carbon 모두 oxygen에 결합된 carbon임을 알 수 있다.

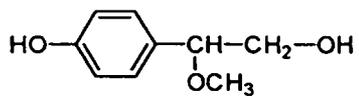
HMQC(Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) spectrum(fig. 20)에서 carbon과 proton 간의 ^1J -coupling을 결정하였다.

HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Correlation) spectrum(fig. 21)에서 47.7ppm의 carbon과 0.87ppm의 methyl proton, 38.7ppm carbon에 결합된 proton과의 long-range coupling을 볼 수 있고, 50.0ppm의 carbon과 0.98 및 1.11ppm의 methyl proton간의 long-range coupling을 관측할 수 있다. 81.9ppm의 carbon과 당의 anomeric proton간의 long-range coupling이 나타난 것으로부터 당의 결합위치를 결정할 수 있다.

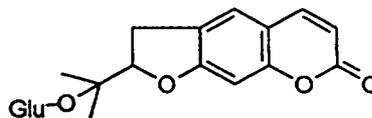
이상의 data를 종합하여 scheme 3의 **Compound IV**와 같은 구조를 가질 것으로 예상되며, -OR의 R기가 현재 NMR data에서 볼 때, methyl기인지, H인지는 결정하기 위해서 Mass spectrum을 측정해야 할 것으로 생각된다. **Compound III**과 **Compound V**는 현재 얻은 NMR spectra 및 Mass data로부터 구조 분석 중에 있다.



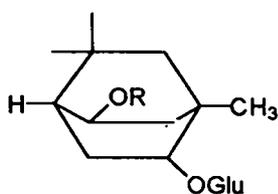
Scheme 1. Extraction and isolation of compounds from *Angelica gigantis radix*



Compound I



Compound II



Compound IV

Scheme 2. Structures of Compound I, II, and IV isolated from *Anelica gigantis* Radix

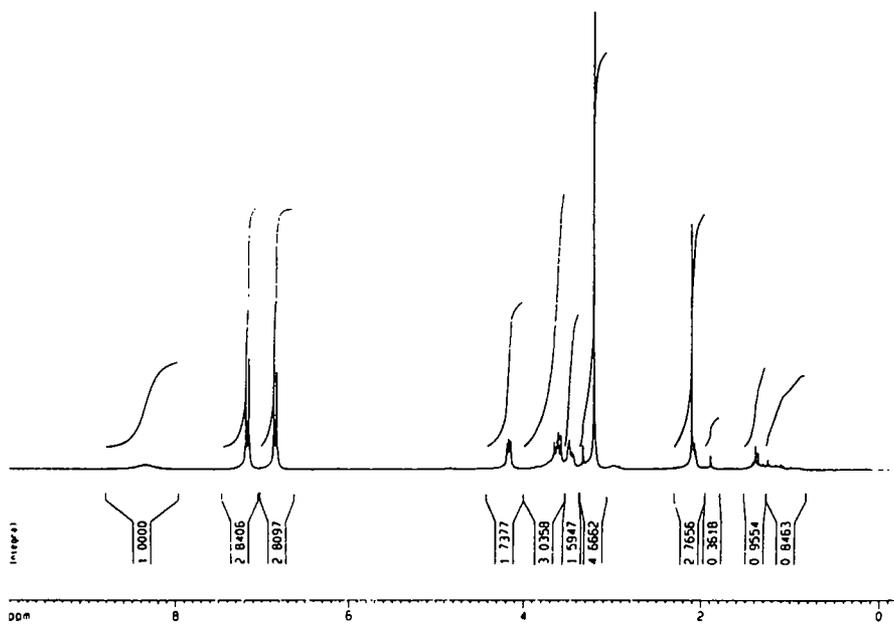


Fig 11. ¹H-NMR spectrum(250MHz) of Compound I

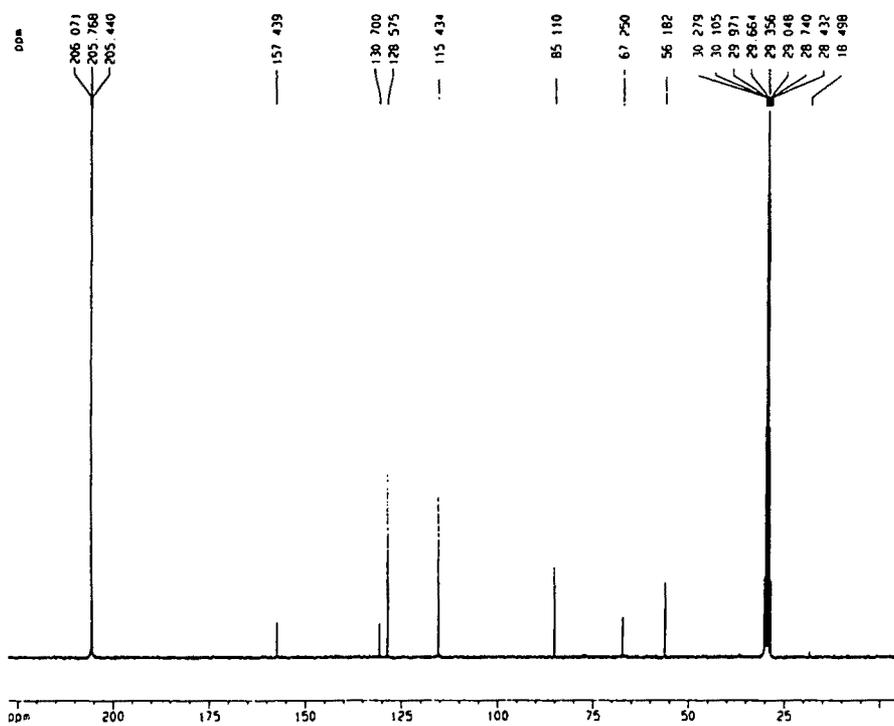


Fig 12. ^{13}C -NMR spectrum(62.9MHz) of Compound I

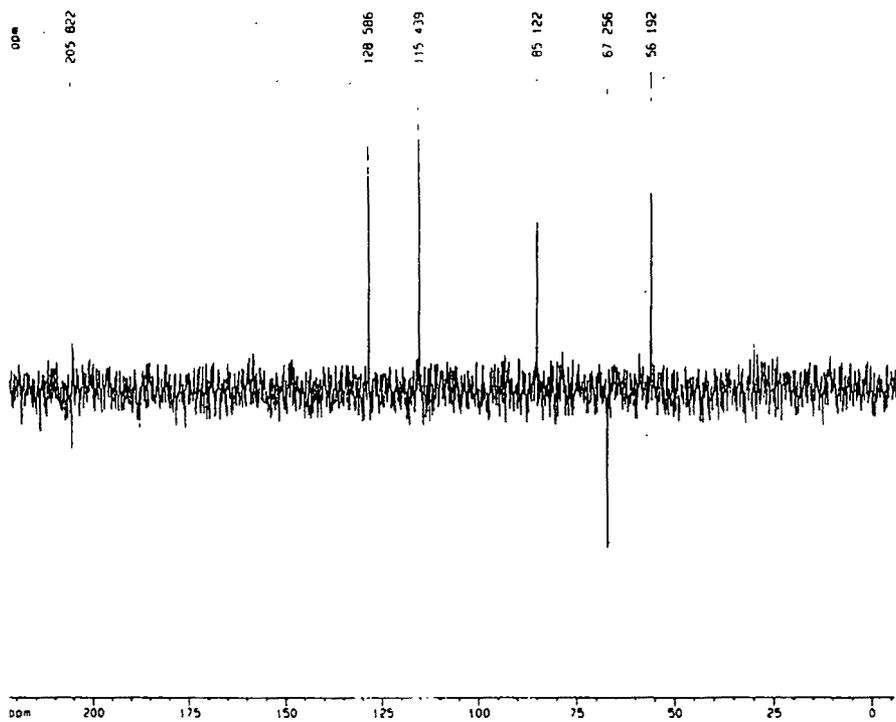


Fig 13. DEPT 135° spectrum(62.9MHz) of Compound I

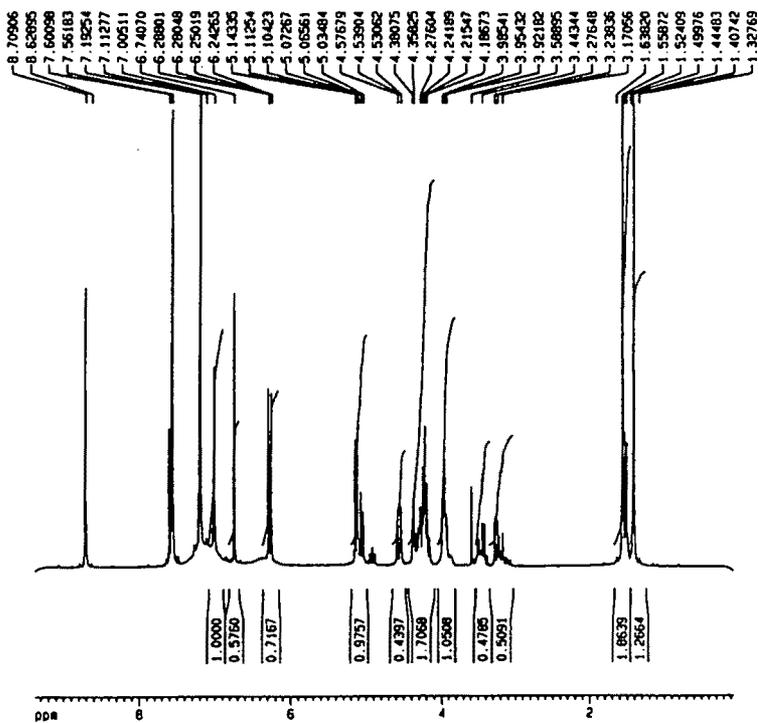


Fig 14. ¹H-NMR spectrum(250MHz) of Compound II

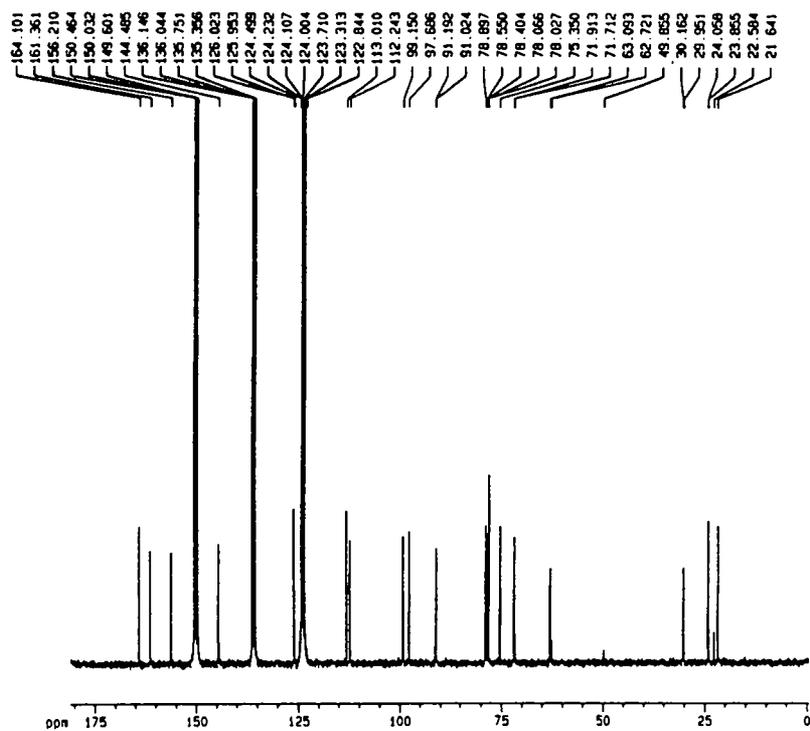


Fig 15. ^{13}C -NMR spectrum(62.9MHz) of Compound II

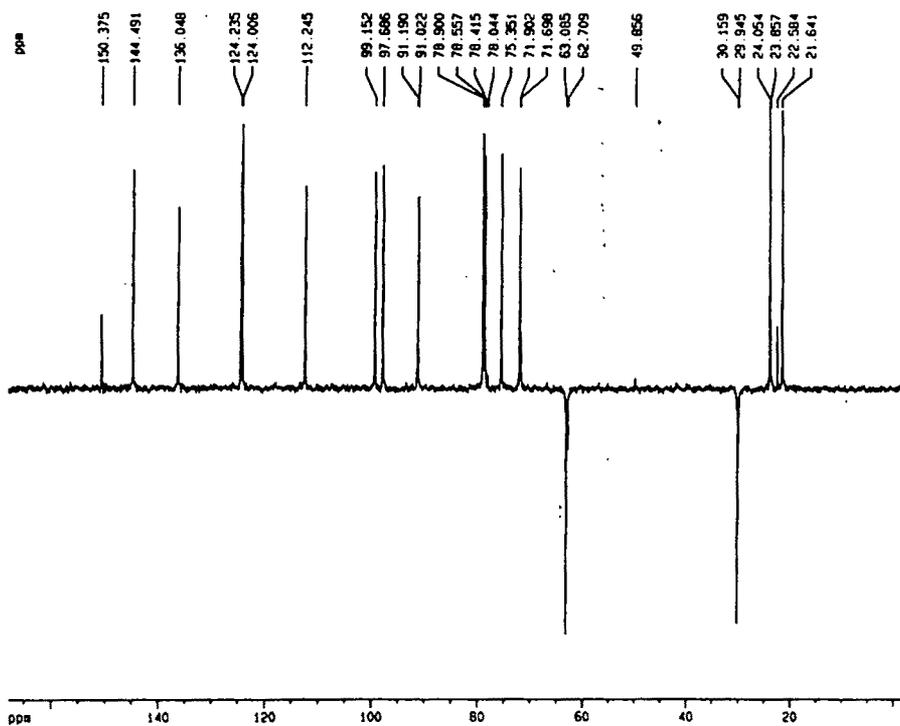


Fig 16. DEPT 135° spectrum(62.9MHz) of Compound II

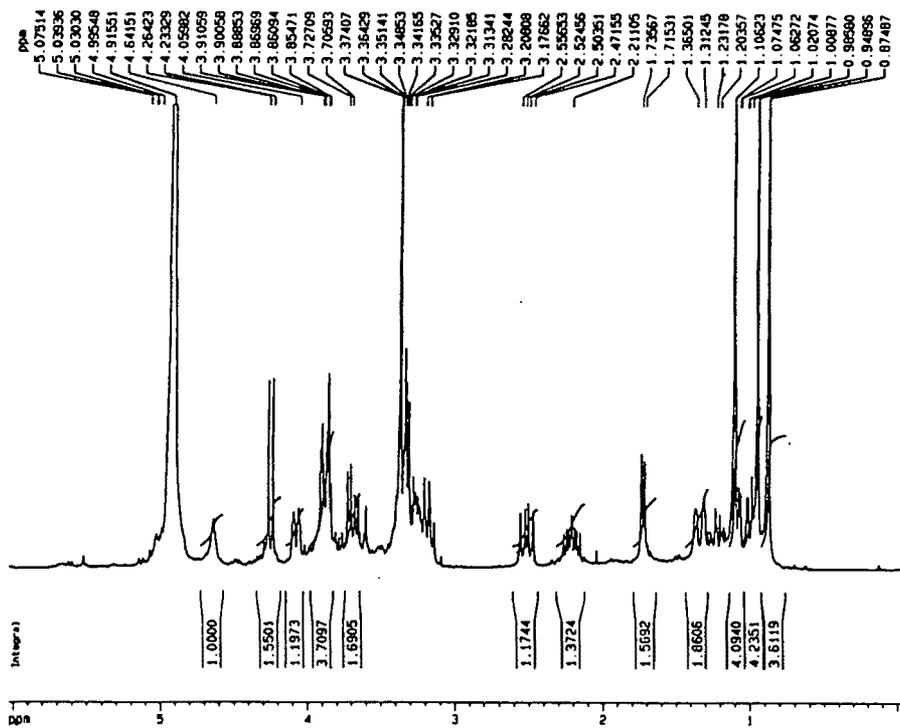


Fig.17 ^1H -NMR spectrum (250MHz) of Compound IV

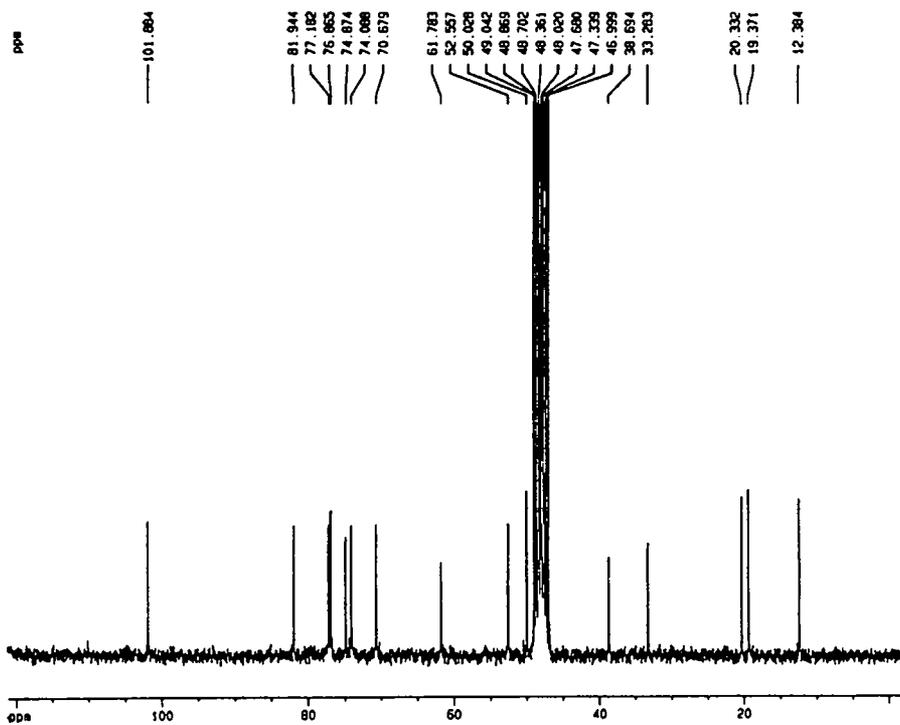


Fig.18 ^{13}C -NMR spectrum (62.9MHz) of Compound IV

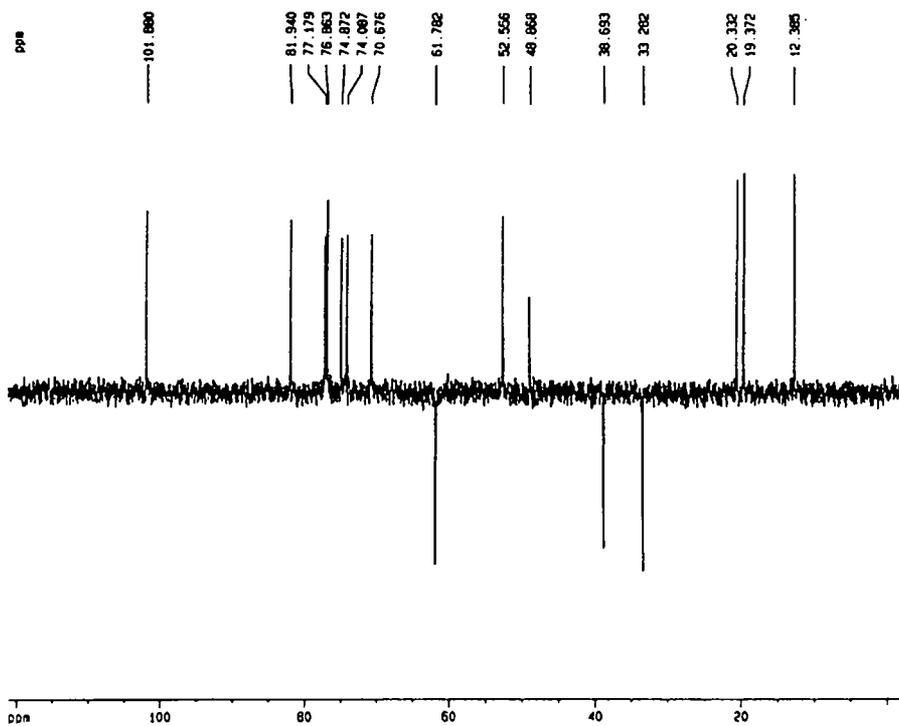


Fig.19 DEPT 135° spectrum (62.9MHz) of Compound IV

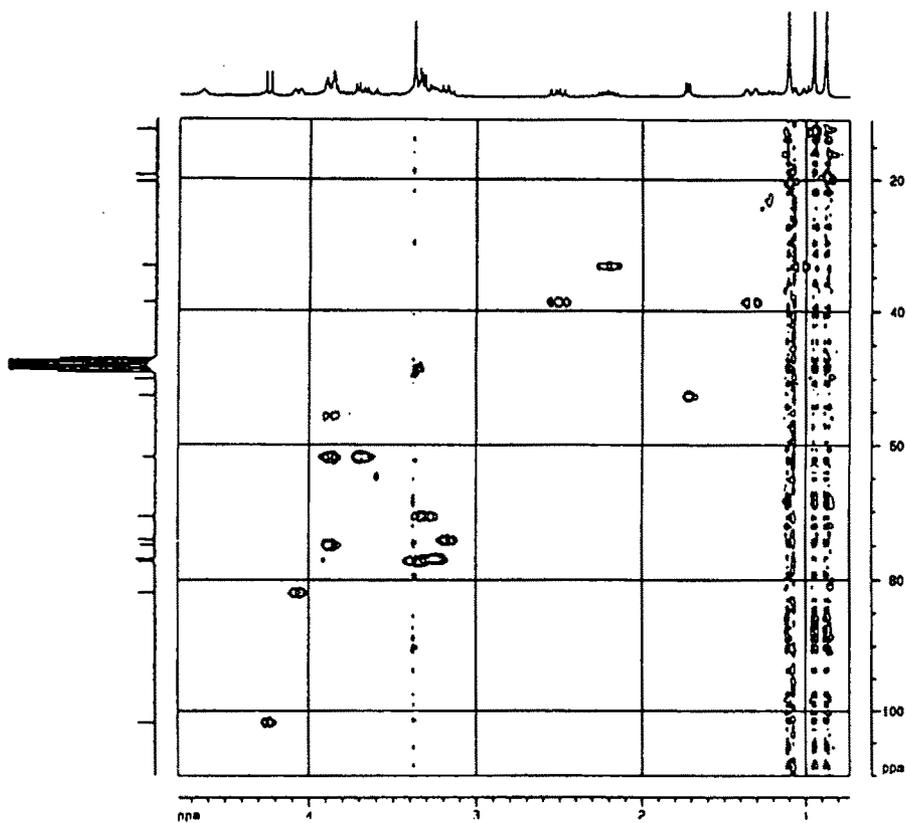


Fig. 20 HMQC spectrum of Compound IV

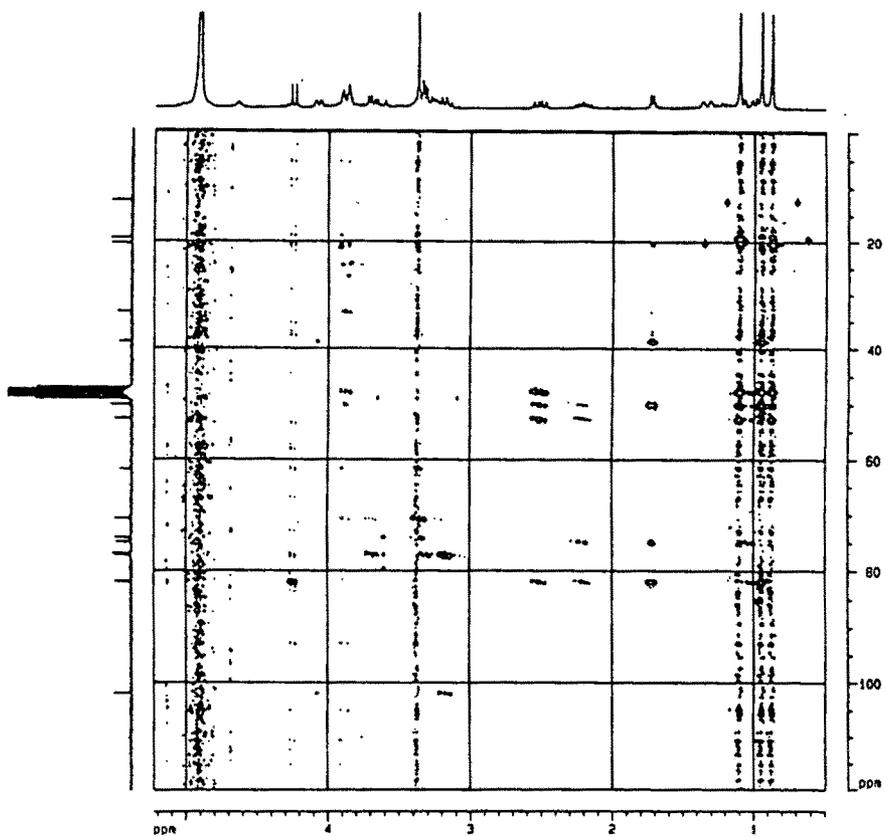


Fig. 21 HMBC spectrum of Compound IV

제 4 절 결론

치매(알츠하이머병)의 예방 및 치료를 위한 기능성 식품소재를 개발하기 위하여 알츠하이머병에 대한 최신지견에 근거를 둔 검색모델을 개발하고 이에 대한 천연물 자원의 효능을 검색하였다. 그 결과, 각 검색모델에서 유효한 활성을 보이는 소재를 검색하였다. 1) 알츠하이머 병의 *in vitro* 모델의 확립: 일차 신경세포배양상에서 베타 아밀로이드 독성 유발 모델을 확립하고 이에 대하여 39종의 천연물 표준 extract의 베타 아밀로이드 차단 활성을 검색한 결과, 곽향, 인진호, 유근피, 차전자등을 검출하였다. 2) 노인성 치매의 병인에 밀접하게 연관된 유해 활성산소(ROS: reactive oxygen species) 억제작용 검색으로서 *in vitro* 및 *in vivo* 검색법을 확립하고 활성 검색을 시행하였다. a) *in vitro* 검색법으로는 brain homogenate로부터 NADPH/ADP/Fe generating system에서 malondialdehyde(MDA)의 생성억제 활성을 측정하였으며, 19 종의 천연물에 대해 검색한 결과, 마란자종, 합환피, 세신, 황련을 검출하였다. b) *in vivo* 검색법으로는 H₂O₂ (15%)의 뇌실내 주사시의 생존시간 연장 효과를 검색하는 것으로서 29 종의 천연물 중에서 천궁, 정향에서 상당한 생존 시간 연장 효과를 관찰하였다. 3) 베타 아밀로이드의 *in vivo* 독성 유발 모델을 확립하고 이에 대한 천연물 표준 extract의 검색을 시행한 결과, 당귀가 유의한 작용을 보였으며, hexan층 및 부탄올층에서 유의한 효과를 나타내었다. 한편, 당귀추출액의 투여는 생쥐의 체중에는 아무 영향이 없었으며, 기타 급성 독성 증상을 전혀 유발하지 않았다. 4) 당귀는 노인성 치매의 병인에 밀접하게 연관된 항염작용 검색에서도 유효하였으며, 그중 buthanol 층이 가장 유효하였으며, 당귀의 buthanol 분획을 다시 소분획하여 검색한 결과, AB10 층이 가장 유효하였다. 또한 당귀는 *in vivo*에서 유해활성산소를 유의하게 억제하였으며, 당귀의 각 분획층에서 hexane 층이 가장 유효하였다. 이상의 결과를 통하여 당귀를 알츠하이머병에 대한 유망한 예방식품소재로 선정하였다. 즉, 당귀는 알츠하이머병의 병인론에 가장 직접적인 관련성이 큰 베타

아밀로이드의 외실내 투여에 의한 수동회피 반응에서 유효하였고, 또한 이병의 병인론에 관련성이 깊은 항산화 활성 및 항염활성도 뛰어 났다. 결론적으로 당귀의 장기간 투여는 알츠하이머병을 예방할 수 있는 효과가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

Choi DW : Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1:623-634, 1988

Choi DW, Maulucci-Gedde MA and Kriegstein AR : Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, 7:357-368, 1987

Cotman CW and Pike CJ: β -amyloid and its contribution to neurodegeneration in Alzheimer's disease, In *Alzheimer's disease* (RD Terry et al.), Raven Press, New York, p305-315, 1994.

Fraser SP, Suh YH, Chong YH, and Djamgoz MBA: Membrane currents induced in *Xenopus* oocytes by the C-terminal fragment of the β -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 66: 2034-2040, 1996.

Fraser SP, Suh YH, and Djamgoz MBA: Ionic effects of the Alzheimer's disease β -amyloid precursor protein and its metabolic fragments. *TINS* 20: 67-72, 1997.

Giulian D, Haverkamp LJ, Yu JH, Karshin W, Tom D, Li J, Kirkpatrick, Kuo YM and Roher AE: Specific domains of amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J. Neurosc.* 16: 6021-6037, 1996.

Glenner GG, and Wong CW: Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.

BBRC 122, 885-890, 1984.

Goodwin JL, Uemura E, and Cunnick JE: Microglial release of nitric oxide by the synergistic action of β -amyloid and IFN- γ . Brain Res. 692:207-214, 1995.

Kim SH, and Suh YH: Neurotoxicity of a carboxy-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. J. Neurochem. 67: 1172-1182, 1996.

Koh JY and Choi DW : Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J. Neurosci. Methods, 20:83-90, 1987

Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiester J, Martins RN, and Beyreuther K: Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. EMBI J 4, 2757, 1985.

McGeer PL, and McGeer EG: The inflammatory response system of brain: implication for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. Brain Res. Rev. 21: 195-218, 1995.

Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos Jr L, Baron P, Villalba M, Ferrari D, and Rossi F.: Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . Nature 374: 647-650, 1995.

Selkoe DJ, Abraham CR, Podlinsky MB, and Duffy LK: Isolation of low-molecular

weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. J Neurochem 46, 1820-1834, 1986.

Selkoe DJ: Alzheimer's disease: genotypes, phenotype, and treatments. Science 275: 630-631, 1997.

Song DK, M. H. Won, J. S. Jung, J. C. Lee, T. C. Kang, H. W. Suh, S. O. Huh, S. H. Paek, Y. H. Kim, S. H. Kim, Y. H. Suh, "Behavioral and neuropathologic changes induced by central injection of carboxyl-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein in mice" J. Neuroch. 71:875-878, 1998.

Wong CW, Quaranta V, and Glenner GG: Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease are antigenically related. PNAS USA 82, 8729-8732, 1985.

제4장 고혈압 및 치매예방소재의 제품화기술개발

제 1절 서론

의료서비스와 보건에 대한 환경이 개선되고 일반 국민들의 건강에 대한 관리수준이 높아짐에 따라 평균수명이 7년 전의 63세에서 94년에는 10년이 증가한 73세로 크게 높아지고 있으며 이에 따라 현재 65세 이상의 노인 인구가 전 인구의 5.4%, 240만 명에 달하고 이는 앞으로도 계속 증가하여 현재 일본의 수준인 전 인구의 15% 수준까지 도달할 것으로 예상되고 있다. 수명이 증가하고 노인인구의 비율이 증가함에 따라서 고혈압, 암, 당뇨병 등 소위 성인병이 비례하여 증가하고 이러한 경향을 반영하여 고혈압, 뇌졸중, 심장병 등을 포함한 순환기계질환에 의한 사망이 93년 전체 사망률의 30%를 점하여 1위를 차지하고 있으며 이 비율은 83년의 28%에서 점차 증가하는 추세를 보여주고 있다. 특히 우리 나라 고혈압증의 유병율은 성인의 약 20%로서 성인 인구 2,500만 명 중 500만 명으로 추산하고 있으며 이중 정규적 치료를 받는 환자는 약 50만 명이며 나머지는 치료에서 방치되어 있는 실정에 있다. 또한 노인인구의 증가는 난치성 뇌질환 즉 노인성 치매인구를 급속히 증가시켜 심각한 사회 문제를 야기하고 있다. 신경세포의 괴사로 인하여 뇌기능이 손상된 치매는 65세 인구의 약 10%, 75세 이상 인구의 25%, 85세 이상 인구의 50%에서 발생하는 것으로 알려져 현재 국내에는 20~30만 명이 앓고 있는 것으로 추산되고 있다.

현대의학의 눈부신 발전에도 불구하고 순환기계질환 등 만성 성인병에 대해서 뚜렷한 치료책을 제시하지 못하고 있기 때문에 성인병을 예방 또는 치료하고자 하는 사람들은 이들 질병에 효과가 있을 것으로 믿어지는 소위 “건강식품”에 대해 보다 많은 관심을 갖게 되고 이러한 배경에서 생리적으로 기능성이 입증된 “기능성” 식품들이 일본을 위시하여 유럽과 미국등 선진국에서 크게 주목을 받고 있다. 이들 생리 조절기능이 강조된 식품을 일본에서는 “기능성 식품”, “특정보건용 식품”으로, 우리 나라에서는 “건강보조식품”으로 구미에서는 “Designer food”, “Neutraceutical”, “Medical food”등으로 불리우고 있으며 이러한

기능을 하는 소재로서 Polydextrose, 대두올리고당, EPA, DHA, 레시틴, 타우린, 파라티노스, β -카로틴, 키틴, 비피더스균 등의 효능이 입증되어 기능성 식품의 제조에 사용되고 있다.

나이가 들어가면 대부분 혈압이 상승하게 되어 있으며 혈압상승을 예방하기 위해서는 저염 식 식사, 적당한 운동, 체중조절, 금연, 절주, 스트레스를 덜 받는 생활 등 비약물요법이 도움이 되는 것으로 알려져 있으며 최근 비약물 요법에 의한 혈압조절 방법에 대한 관심이 점차 높아지고 있다.

혈압을 조절하기 위한 혈압강하제로는 이뇨제, 베타 차단제, 교감신경억제제, 혈관확장제, 칼슘길항제, 안지오텐신전환효소 억제제 등이 사용되고 있으나 이들은 대부분은 혈액점도를 높이거나 전해질의 불균형 유발, 당뇨병 유발, 심부전증 악화, 기력감퇴, 신장기능 장애 등의 부작용을 야기하는 경우가 많고 이들을 평생 복용해야 하는 문제점 등이 있기 때문에 치료 중 탈락되는 비율이 78%에 달하고 있다. 따라서 고혈압이나 뇌졸중 및 치매의 예방이나 그 발생을 지연시키기 위해서는 부작용이 없으며 지속적으로 섭취할 수 있는 식품형태의 제품개발이 요구되고 있다.

식품 성분이 갖는 여러 가지 생체조절기능 중에서 peptides물질이 혈압상승 원인의 하나인 angiotensin converting enzyme(ACE, dipeptidyl carboxypeptidase, EC 3.4.1.15)에 대해 저해작용이 있다는 사실이 밝혀지면서 관련식품의 기능 특성 해명에 많은 관심이 모아지고 있다. 고혈압의 대부분을 차지하는 본태성 고혈압의 발생 기작에서 renin-angiotensin system이 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. 여기에 관여하는 효소인 ACE는 renin에 의해 생성된 생체 중에 존재하고 있는 불활성형의 decapeptide인 angiotensin I의 C말단의 dipeptide(His-Leu)을 절단하여 강력한 혈관수축 작용을 갖는 octapeptide인 angiotensin II를 합성하는 단계에 관여하는 효소이다. 이렇게 생성된 angiotensin II는 그 자체가 혈관수축작용을 할뿐만 아니

라, adrenal cortex에서 aldosterone의 분비를 촉진함으로써 물과 sodium의 배설을 억제하여 강한 혈압상승작용을 가진다. 또한, ACE는 강한 혈관확장작용을 갖는 bradykinin을 불 활성화시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다 (Adams, 1988).

국내외에서 우리가 일상적으로 섭취하는 농수산물소재로부터 혈압상승을 억제하는 ACE 저해효능을 확인하여 보고한 바가 있기 때문에 각종 국산 농수산물 자원 및 생약자원을 대상으로 보다 조직적이고 효율적인 탐색을 실시한다면 혈압조절 소재는 물론 뇌졸중 및 치매 예방 소재들의 발굴이 가능할 것으로 판단된다.

특히, 현재까지 식품소재로부터 분리된 ACE저해인자들은 가열조리에 비교적 안정하며 체내에서의 흡수도 용이한 저분자의 물질로 밝혀져 혈압 강하제와 비교하였을 때, 대체적으로 낮은 활성을 갖지만 대량으로 상시 섭취하는 식품 중에 존재한다는 점에서 더 유용성이 기대된다.

현재까지 국산 천연자원으로부터 유효한 순환기질환 및 치매의 예방 또는 치료소재가 개발되지 못한 것은 효율적인 *in vitro* 및 *in vivo* 탐색 방법을 사용하지 못하였거나 탐색 대상이 매우 제한되었기 때문으로 본 연구에서 새로운 탐색방법을 사용하여 조직적으로 연구를 실시한다면 다양한 기능성 소재들이 개발될 것으로 보인다.

또한 현재 그 효능이 과학적으로 입증되지 않은 수많은 건강식품들이 판매되어 소비자들도 오도 또는 혼란스럽게 하고 있는 실정이므로 국내외적으로 가장 대표적 성인병인 고혈압, 뇌졸중 및 치매에 대해서 과학적으로 효능이 입증되고 일상적으로 쉽게 섭취, 이용할 수 있는 기능성 식품을 개발, 공급하려는 노력은 소비자들의 복지를 위해서도 꼭 필요하다.

생약자원 등 국산 농수산물 자원으로부터 사회적 수요가 크게 나타나고 있는 고혈압, 뇌졸중 및 치매의 예방 및 치료보조효과를 갖는 기능성 소재를 탐색한 다음 이의 효능을 동물실험을 통하여 평가하고 이를 바탕으로 최종 선별된 소재를 활용하여 식품으로써 다량 소비될 수 있는 기능성 식품을 개발, 공급함으로써 원료 농수산물을 생산하는 농민들의 소득을 제고하고 아울러 시장개방체제에서 우리 나라의 농민들에게 적합한 경쟁력 있는 고소득 대체작물

을 제시하는 것이 본 연구개발의 최종목표이다.

제 2절 실험재료 및 방법

1. 고혈압 예방 생약소재의 탐색

가. 생약소재로부터 ACE 저해 소재탐색

1) 추출물의 제조

생약재는 서울 경동시장에서 구입한 건조시료를 분쇄기를 사용하여 분말상태로 만들었으며, 각각 3g의 분말시료에 70%에탄올 150ml을 가하여 현탁시킨 다음 60℃ 수욕조상에서 2시간 환류냉각 추출하고 여과(여과지 Whatman No.1)하여 1차 여과액으로 하고, 다시 남은 잔사에 70%에탄올을 가하여 60℃ 수욕조상에서 2시간 동안 추출한후 여과한 여과액을 1차 여과액과 합한 다음 rotary evaporator로 감압농축하여 동결건조 한 후 실험용 시료로 사용하였다.

2) 실험방법

ACE inhibition activity의 측정은 Cushman 과 Cheung의 방법에 따랐다. 즉, 적정 농도로 준비된 시료 50 μ l에 ACE 조효소액 50 μ l, 0.3M NaCl을 함유하는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 8.3) 100 μ l를 가한 후 37°C에서 5분간 preincubation 시켰다. 여기에 기질로써 Hippuryl-His-Leu용액 (25mg/2.5ml potassium phosphate buffer) 50 μ l를 가하여, 다시 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 1N HCl 250 μ l를 가하여 반응을 정지시켰다. (control은 시료용액 대신에 증류수 50 μ l를 사용하였으며, blank는 1N HCl 250 μ l를 가한 다음 ACE 조효소액 50 μ l를 가하였다.) 여기에 ethyl acetate 1.5ml를 가하여 15초간 vortex한 후 3000rpm 에서 5분간 원심분리시켜 상층액 1ml를 취하였다. 이 상층액을 Temp-Block module heater로 120°C에서 30분간 건조시킨 후 증류수 3ml을 가하여 용해시킨 다음 228nm에서 흡광도를 측정하여 아래 식에 의하여 ACE 저해율로써 나타내었다.

$$\text{inhibition(\%)} = \frac{(A_c - A_b) - (A_s - A_b)}{(A_c - A_b)} \times 100$$

A_c : 시료대신 증류수 첨가구의 흡광도

A_b : 반응 정지 시킨 후 시료 첨가

(control과 sample에 대한 각각의 blank)

A_s : 시료 첨가 후의 흡광도

2. 선별된 고혈압 예방 생약소재의 *in vitro* 유효농도 조사 및 기호도 조사

ACE저해능 측정 결과, ACE저해율과 동결건조물의 수율면에서 우수한 값을 갖는 시료에 대해 ACE를 50%저해시키는 농도 즉, IC_{50} (mg/ml)를 구하였다.

또한 ACE저해능 평가 후 선정된 10개의 유효시료에 대해서 식품소재로서의 수용성을 살펴보기 위하여 관능평가를 실시하였다. 검사요원은 한림대학교 식품영양학과 대학원생들 10인을 대상으로 하였으며 검사요령은 각각 적정온도에서 추출한 다음 동결건조한 시료를 일정농도의 물에 희석하여 색-냄새-맛의 순서로 관능검사를 실시하였다. 색은 강중약으로 정도를 기록하고 특히, 냄새는 손을 시료용기에 대지 않고 코를 가까이(일정한 거리 유지)하여 3-4번 일정속도로 짧게 들며 마시면서 평가하였다. 맛은 일정량(액체5-10ml)을 입에 넣고 씹거나 삼킨 후 평가하였다. 향미 특성 용어를 충분히 인식시킨 후 개인별 느낀 그대로를 자유롭게 기술하도록 하였다. 약초시료를 평가하기 위하여 관능적 특성 중 냄새로는 시료고유의 향, 풀냄새, 종이냄새, 한약 냄새 등이 사용되었고 맛은 단맛, 쓴맛, 떫은 맛, 시료고유의 맛 등을 기본으로 하였다.

3. 고혈압 억제소재의 안정성 조사

ACE 저해활성이 높은 소재 중 동물실험으로 혈압강하효과가 확인된 마늘, 표고버섯, 두충, 상백피 시료의 산과 온도에 대한 안정성을 측정하였다.

가. pH의 영향

0.1N NaOH 또는 HCl을 사용하여 pH를 2.0~12.0으로 조절한 용액에 적정농도로 용해시킨 후 1시간 동안 반응시킨 시료용액의 ACE저해활성을 측정하였다.

나. 온도의 영향

마늘, 표고버섯, 두충, 상백피를 70% Ethanol로 추출시키되 각 시료를 80℃, 100℃에서 30min, 1hrs, 2hrs동안 추출하여 ACE저해활성의 변화를 측정하였다.

4. 마늘 및 당귀의 유리당 및 아미노산 분석

가. 유리당

마늘 및 당귀의 유리당 추출은 A.O.A.C. 법으로 하였다. 즉, 시료 3g을 tall beaker에서 정확히 평량한 후 50% EtOH 100 mL를 넣어 전체의 무게를 잰 후, 80~85℃의 증탕으로 옮겨 가끔 저어주면서 30분간 추출하였다. 이를 실온까지 방냉시킨 다음 초기의 무게가 되도록 50% EtOH를 첨가 혼합한 후 추출액을 0.45 μ m membrane 필터로 여과하여 유리당 조성 분석시료로 사용하였다. 실험에 사용한 fructose, glucose, sucrose 등의 표준물질(sigma, U.S.A.)은 50% 에탄올에 녹여 3점을 이용한 검량곡선을 작성하여 분석하였고, 이 때 HPLC(Jasco, Japan) 분석에 사용한 컬럼은 carbohydrate analysis column(Waters, U.S.A.), 용매는 80% acetonitrile, 이동속도는 1.5 mL/min, 검출기는 light scattering(Sedex 55, France), 주입량은 10 μ L 이었다.

나. 유리아미노산

마늘 및 당귀의 전처리는 허 등의 방법에 준하였고, 시료 용액에 존재하는 단백질을 비롯한 분자량이 큰 화합물, 지방, 색소 등을 제거하기 위해 먼저 Sep-Pak C₁₈에 메탄올 5 mL을 흘려 활성화시키고 여기에 탈이온수로 10 mL를 흘려 잔여 메탄올을 씻어냈다. 3-4번의 공회전으로 Sep-Pak C₁₈에 존재하는 공기와 잔여 H₂O를 밀어낸 후 용액 I (0.1% trifluoro-acetic acid)을 10 mL씩 두 번 Sep-Pak 카트리지에 통과시켰다. 용액 II (용액 I : methanol : = 80 : 20) 10 mL을 다시 Sep-Pak 카트리지에 재통과시킨 후 용액 III (용액 I : methanol = 70 : 30)과 시료 용액을 2 : 1로 혼합하여 Sep-Pak에 통과시켜 초기의 1 mL는 버리고 나머지를 분석용액으로 사용하였다. 유리 아미노산 측정은 AccQ·Fluor Reagent Kit를 사용하여 AccQ·Tag 방법으로 유도체화시켜 분석하였다. 즉, 여과된 유리아미노산 시료 10 μ L를 취하여 tube(6×50mm) 밑바닥에 조심스럽게 담고 여기에 AccQ·Fluor Reagent Kit의 1용액 70 μ L를 넣고 vortex mixer로 혼합한 후 미리 55°C에서 반응시킨 2A 용액 10 μ L를 넣어 재혼합하였다. 이를 실온에서 1분간 방치한 후 55°C에서 10분간 유도체화 시킨 다음 HPLC로 유리 아미노산을 측정하였다. 분석에 사용한 아미노산 표준물질은 amino acid standard H(PIERCE, U.S.A.)이었고, 컬럼은 Nova·Pak column C₁₈ (Waters, U.S.A.), 이동상 A용액은 1 L에 0.14 M sodium acetate trihydrate와 0.05% triethylamine이 각각 함유된 다음 HPLC용 H₂O로 정용한 후 인산으로 pH 4.97로 조정하였으며, 이동상 B 용액은 60% acetonitrile를 사용, gradient법으로 표 1과 같다. 검출기는 fluorescence detector(Ex. 250 nm, Em. 395 nm, Jasco, Japan), 주입량은 5 μ L로 autosampler(Jasco, Japan)를 사용하였다.

표 1. HPLC에 의한 유리 아미노산 분석

Column: Nova-Pak C₁₈ column(3.9×150 mm)

Detector: fluorescence detector(Ex. 250 nm, Em. 395 nm)

Mobile phase: gradient method

Cycle time of injection: 50 min

Injection volume: 5 μL

Column temp.: 37°C

Time(min)	Flow rate(mL/min)	% A ¹⁾	% B ²⁾	Curve
Initial	1.0	100	0	*
0.5	1.0	98	2	6
15.0	1.0	93	7	6
19.0	1.0	90	10	6
32.0	1.0	67	33	6
33.0	1.0	67	33	6
34.0	1.0	0	100	6
37.0	1.0	0	100	6
38.0	1.0	100	0	6
49.0	1.0	100	0	6

1) % A: 0.14 M sodium acetate trihydrate에 0.05% triethylamine을
 넣고 HPLC용 증류수로 1 L로 정용하여 phosphoric acid로
 pH 4.97로 조절

2) % B: 60% acetonitrile 용액

5. 시제품 제조

가. 마늘 가공품의 제조

마늘의 매운맛을 생성하는 효소를 불활성화시키기 위해서 껍질을 깠 마늘 인편을 100℃의 수증기에서 5~30분간 처리하거나 가정용 전자렌지에서 30초~1분간 열처리 한 다음 매운맛의 제거정도를 관능으로 평가하였다. 열처리 후 50℃의 건조기에서 수분이 15%이하까지 건조한 다음 분쇄하여 건조분말을 제조하였다. 초절임 마늘은 껍질을 깠 마늘 인편을 물, 식초, 설탕, 소금이 다양하게 배합된 용액에, 그리고 간장절임 마늘은 마늘인편을 각각 넣은 후 실온에서 3개월까지 저장하면서 색상 및 맛의 변화를 조사하여 부식으로서의 섭취가능성을 살펴보았다.

나. 당귀가공품의 제조

건조당귀 20g에 물 또는 70% ethanol을 200ml씩 가하여 물의 경우 80℃와 100℃ 그리고 ethanol용액의 경우 70℃에서 1시간씩 교반하면서 추출하여 추출 수율과 추출물의 관능특성을 조사하였고, 아울러 당귀 100g에 물 500ml을 가하고 상업용 한약 추출기(한일엠-이주식회사)를 사용하여 약 100℃에서 압착 추출하여 추출수율과 추출물의 성상을 조사하였다. 추출물의 청징도, 색상, 냄새 및 맛의 특성은 묘사법에 의하여 평가되었다.

당귀 가공품으로 당귀 젤리는 젤라틴, 설탕, 물 및 약 16° Bx의 당귀추출물을 적당량 혼합하여 제조하였고, 당귀양갱은 한천과 물, 설탕 및 당귀 추출액을 적절하게 혼합하여 제조하였으며, 당귀묵은 시판도토리묵 분말에 당귀추출액을 첨가하여 제조하였다. 또한 당귀추출액과 과즙상태의 사과, 배, 당근, 포도, 귤 및 토마토를 다양한 양 배합한 다음 전체적인 맛과 성상을 묘사법으로 평가하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 고혈압 예방생약소재의 탐색

가. 생약소재 추출물의 ACE저해능 조사

생약재중 건강식품 또는 기능성식품소재로 활용 가능하다고 판단되는 80여종의 시료를 구입하여 70%에탄올로 추출한 다음 동결건조한 후 ACE저해활성을 조사한 결과는 표 2와 같다. 표에서 보면 추출물의 ACE 저해활성이 90%이상인 것으로서 현초, 건칠, 복분자, 송절, 측박 등이 있고, 건조추출물의 수율을 고려하여 원료의 중량당 ACE저해활성을 비교해 보면 파극, 단삼, 복분자, 속단, 우슬, 측박, 현초, 감초 및 인삼이 높은 ACE저해율을 나타내고 있다. 특히 건칠, 복분자, 송절의 추출물은 ACE저해활성이 100%수준에 달하여 이들의 경우 농도를 낮추어 정확히 활성을 측정할 필요가 있을 것으로 생각된다.

표 2. 몇가지 식품소재의 70%에탄올추출물에 대한 ACE저해능 분석

시료	동결건조물수율(%)	ACE저해율(%)
감인	1.10	85.28 ^a
감잎	17.00	- 0.49 ^b
감초	25.33	54.41 ^a
건칠	10.33	99.00 ^a
결명자	13.00	7.11 ^a
계피	7.67	31.86 ^a
국화	33.33	15.44 ^a
느릅나무	13.33	38.10 ^a
단삼	44.33	58.98 ^a
당귀	40.00	12.47 ^a
대계근	13.00	- 61.85 ^b
독활	18.00	20.23 ^a
동계자	12.33	21.08 ^a
동과자	14.67	27.45 ^a
만형자	5.33	15.20 ^a
맥문동	30.00	22.21 ^a
모과	31.00	- 89.51 ^b
방풍	5.00	- 14.85 ^b
백모근	12.67	-132.11 ^b
백출	29.00	- 6.36 ^b
복령	1.40	13.29 ^a
복분자	21.00	99.00 ^a
부처손		79.17 ^a
사상자	7.00	- 23.62 ^b
산약	9.67	59.54 ^a
산조인	13.67	69.61 ^a
상기생	19.33	- 1.98 ^b

(a : ACE inhibition activity , b : ACE activation activity)

continued-

시료	동결건조물 수율(%)	ACE저해율(%)
새삼씨	9.67	29.44 ^a
석곡	8.67	28.02 ^a
석창포	8.67	53.34 ^a
세신	10.00	- 60.11 ^b
소자	5.00	40.69 ^a
속단	41.00	47.38 ^a
송절	9.67	99.00 ^a
쇠비름	13.33	39.72 ^a
승마	15.00	12.31 ^a
시호	19.67	31.13 ^a
신이화	10.33	87.61 ^a
약쑥	10.33	-124.19 ^b
여정실	24.33	32.06 ^a
영지	7.50	76.47 ^a
오갈피	10.33	- 43.38 ^b
오디	15.67	- 9.07 ^b
왕불류행	11.00	54.99 ^a
우슬	23.00	71.08 ^a
원지	26.00	- 30.12 ^b
육종용	40.00	- 1.83 ^b
익모초	15.00	- 4.87 ^b
인삼	19.00	55.87 ^a
인진	13.67	- 25.52 ^b
작약	14.00	-150.63 ^b
잔대	20.00	- 0.74 ^b
접골목	6.67	1.73 ^a

-continued-

시료	동결건조물 수율(%)	ACE저해율(%)
정력자	12.33	68.87 ^a
지부자	15.00	-120.59 ^b
지실	15.00	- 8.30 ^b
지황	64.00	- 1.47 ^b
차전자	-	90.38 ^a
창이	9.00	10.78 ^a
창출	16.00	32.29 ^a
천궁	12.00	-273.12 ^b
천마	-	8.63 ^a
천문동	44.00	17.11 ^a
초용담	46.67	- 9.80 ^b
측박	15.67	97.52 ^a
철	21.33	- 40.20 ^b
택사	21.00	21.08 ^a
파극	27.00	77.65 ^a
포황	13.67	59.95 ^a
하수오	21.00	28.71 ^a
황기	27.00	- 88.96 ^b
황벽	12.67	12.90 ^a
현초	14.33	99.00 ^a
소회향	12.33	38.73 ^a

(a : ACE inhibition activity , b : ACE activation activity)

2. 고혈압 예방 생약소재의 *in vitro* 유효농도 조사 및 기호도 조사

1차년도 연구에서 ACE저해능이 높은 10종의 생약재 시료에 대해 동결건조물의 수율과 ACE활성을 50%저해시키는 농도, 즉 IC₅₀(mg)을 구한 결과 표 3과 같다.

표. 3 고 ACE저해 생약소재의 수율 및 ACE저해농도

시 료	A(%)	B(%)	A×B/100(%)	IC ₅₀
	freeze-dried extract/sample	ACE inhibitory activity		
감초	28.73	67.92	19.51	3.35
건칠	11.77	91.06	10.72	2.96
두충	17.33	72.14	12.50	4.80
복분자	21.30	72.41	15.42	2.71
상백피	19.33	82.07	15.86	1.93
송절	24.07	99.00	23.83	1.01
우슬	30.10	74.01	22.28	3.20
차전자	6.20	99.00	6.14	1.54
측백	18.43	89.60	16.51	0.98
파극	43.00	77.65	33.39	2.13

* IC₅₀ (mg) : ACE활성을 50%저해하는데 요구되는 시료의 농도를 말한다.

동결건조물의 수율은 우슬이 30.1%, 감초가 28.7%로 높게 나타났으며, 시료에 대한 ACE저해율은 송절이 가장 높고 이어서 우슬과 감초가 높게 나타났다. 한편, 선별된 동결건조추출물에 대해 ACE를 50%저해하는데 필요한 양(IC₅₀)을 측정하여 유효농도를 서로 비교하였다. 생약재의 유효농도(mg/ml)에서 감초추출물 3.35, 건칠추출물 2.96, 두충추출물 4.8, 복분자추출물 2.71, 상백피추출물 1.93, 송절추출물 1.01, 우슬추출물 3.20, 차전자추출물 1.54, 측백추출물 0.98, 파극추출물 2.13을 나타냈다.

ACE저해능 평가 후 선별된 10개의 약초시료에 대해서 식품소재로서의 수용성을 살펴보기 위하여, 적정온도에서 추출하여 각각 동결 건조한 시료를 일정농도의 물에 희석하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사요원들에게 일정한 순서 없이 맛을 보게 한 후 자유롭게 맛, 향, 냄새, 기호도를 서술하는 방법을 선택하였다.

ACE저해율과 수율을 고려하여 선별된 10개 약초 즉 감초, 건칠, 두충, 복분자, 상백피, 송절, 우슬, 차전자, 측백, 파극 중 건칠은 피부염을 일으킬 소지가 있으므로 맛보기에서 제외되었고, 송절의 경우는 그 자체의 65-70%가 기름성분을 가지고 있으므로 물에 용해되기 어려웠으며, 파극은 적량을 섭취하지 않으면 부작용을 일으킬 우려가 있고, 감초는 장기간 복용시 혈압을 상승시킬 수 있기 때문에 제외시켰다. 관능검사의 결과 전체적으로 풀냄새가 나는 것이 대부분이며, 복분자의 쓴맛, 측백의 짙은 맛은 기호성을 떨어뜨리므로 최종적으로 두충, 상백피 두개의 소재를 가지고 *in vivo*에서의 효과를 검색하기 위한 시료로 결정하였다.(Table 4.)

Table 4. Sensory test of some medicinal herb extracts

Samples	Color	Flavor	Taste
감초	황갈색(중)	감초특유의 진한 단향	감초맛 강함. 단맛
두충	황갈색(약)	초콜렛 향, 고소한 과자향	달콤하고, 수용가능한 맛
복분자	황색(강)	향긋한 풀냄새	뽕은 맛, 쓴맛, 오래 남는 맛
상백피	황색(약)	한약 냄새, 건초 향, 좋은 향	은은한 맛
송절	황갈색(강)	소나무 향, 잣향, 소독 냄새	소나무맛, 뽕은 맛, 진한 맛, 약맛
우슬	황갈색(강)	삶은 고구마 향, 나무 뿌리향	단맛, 무미, 양호
차전자	흑갈색(약)	삶은 고구마 냄새, 고소한 향,	특별한 맛이 없음, 식용유와 같은 미끈한 맛,
측백	황색(강)	풀냄새, 박하향, 건초냄새	달콤한 맛, 진한 한약 맛, 치약 맛
파극	진보라색(중)	거의 없음	아린 맛

3. 고혈압억제소재의 안정성 조사

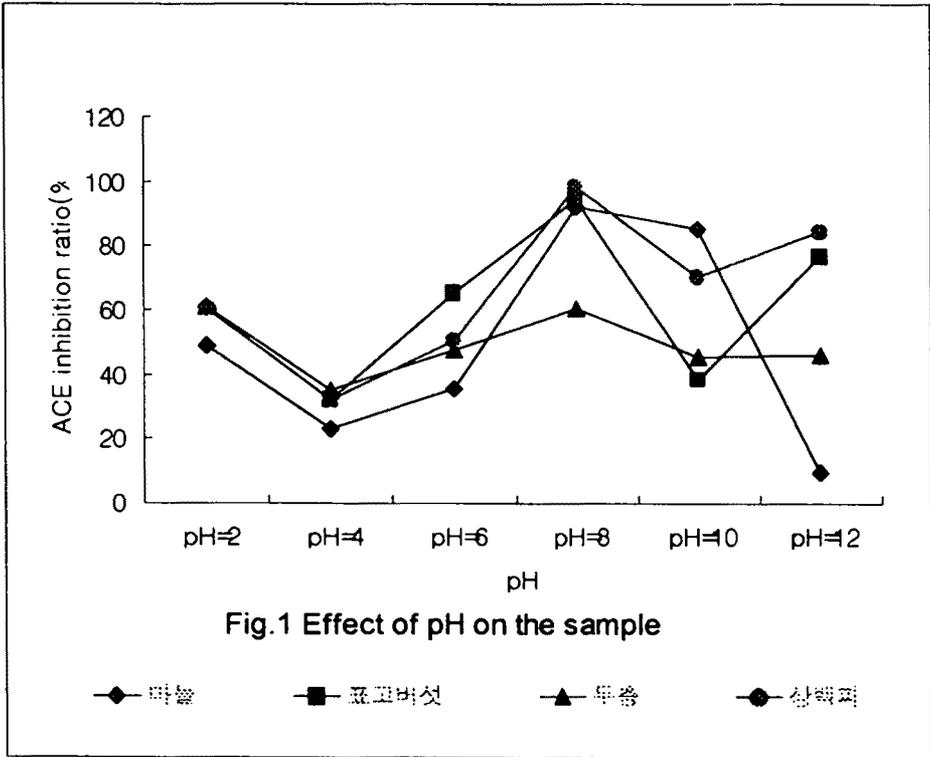
ACE 저해활성이 높은 소재 중 동물실험으로 혈압강하효과가 확인된 마늘, 표고버섯, 두충, 상백피 시료의 산과 온도에 대한 안정성을 측정하였다.

가. pH에 대한 안정성

0.1N NaOH 또는 HCl을 사용하여 pH를 2.0~12.0으로 조절한 용액에 적정농도로 용해시킨 후 1시간 동안 반응시킨 시료용액의 ACE저해활성을 측정한 결과, 각 시료의 pH에 대한 안정성은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 대체적으로 pH=8에서 가장 높은 ACE저해활성을 보였다. 반면 대부분 pH=4에서 가장 낮은 저해활성을 나타내었으나 특히, 마늘의 경우 강 알칼리에서 ACE저해율이 급격히 낮아짐을 보였다. 전체적으로 pH=6~8에서는 비교적 안정하다고 할 수 있다(Fig. 1).

나. 온도에 대한 안정성

마늘, 표고버섯, 두충, 상백피를 70% Ethanol로 추출시키되 각 시료를 80℃, 100℃에서 30min, 1hrs, 2hrs동안 추출하여 ACE저해활성의 변화를 측정하였다. 80℃에서 30min간 열처리하였을 때 표고버섯을 제외한 마늘, 두충, 상백피의 경우 ACE저해율은 다른 온도와 시간 때 보다 가장 높은 감소율을 보였다. 또한 100℃에서 30분간 열처리하는 오히려 ACE저해율이 감소되지 않았고 유지되고 있었다. 시료별로 보면, 마늘은 온도와 시간에 따라 ACE저해율이 비교적 안정된 값을 나타내었고 두충과 상백피는 80℃에서 30분 동안 열처리하였을 경우 초기에 ACE저해활성이 급격히 감소되지만 그 후에는 다시 높은 저해율을 보였다. 표고버섯은 온도와 시간에 따라 민감하게 반응하여 비교적 안정하지 않은 소재임을 알 수 있다. 이상의 실험에서 마늘이 pH, 온도의 변화에 가장 안정한 소재라는 결론을 얻었다(Fig. 2).



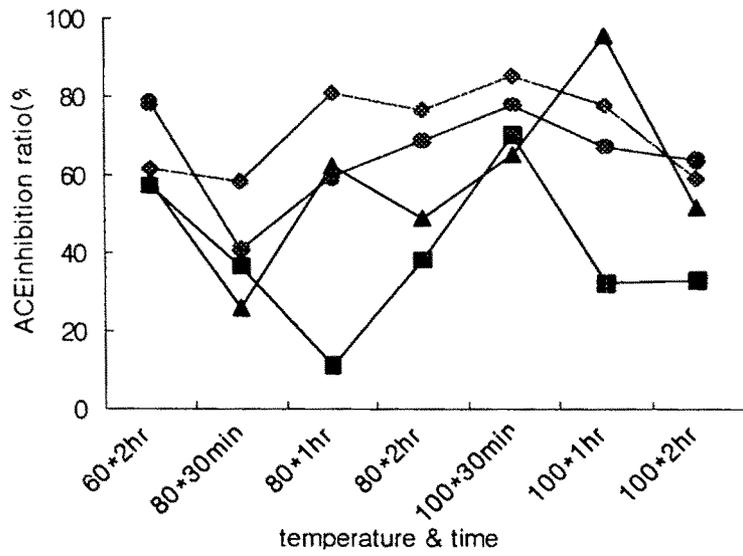


Fig.2 Effect of temperature and time on the sample

◆ 마늘 ■ 표고버섯 ▲ 두충 ● 상백피

4. 마늘 및 당귀의 유리당 및 아미노산 분석

항고혈압효과를 나타낸 마늘과 치매 억제 효능을 보인 당귀의 유리당 분석을 행한 결과 표 6에서 보는 바와 같이 건조 당귀 분말의 경우 glucose와 fructose는 검출되지 않았고 sucrose가 18.8%나 다량 함유되어 있었다. 한편 마늘 분말의 경우 fructose가 4.2%, glucose가 2.5% 그리고 sucrose가 3.2%로 세 종류의 당이 고루 함유되어 있었다.

표 6. 마늘 및 당귀의 유리당 분석

단위 : %

시료	fructose	glucose	sucrose
마늘분말	4.2	2.5	3.2
당귀분말	.	.	18.8

마늘과 당귀의 유리아미노산 분석결과를 살펴보면 (표. 7) 마늘의 경우 arginine이 2648.5mg%로 특별히 다량 함유되어 있었고 이어서 serine, proline, aspartic acid 및 glutamic acid가 100mg%이상으로 다량 분석되었다. 당귀의 아미노산 조성을 보면 역시 arginine이 1615mg%로 다량 함유되어 있었고 이어서 glutamic acid, alanine, serine이 많이 존재하였다.

표 7. 마늘 및 당귀의 유리아미노산 분석

단위 : mg%

아미노산	마늘분말	당귀분말
Asp	109.2	82
Glu	107.2	171.3
Ser	289.4	125.7
Gly	7.0	7.3
His	53.1	78.1
Arg	2648.5	1615.4
Thr	28.2	15
Ala	19.7	142.4
Pro	113.2	39.8
Tyr	0.0	12.5
Val	47.5	42.1
Met	0.0	0.0
Cys	0.0	0.0
Ile	13.5	35.1
Leu	21.3	16
Phe	42.6	15.7
Lys	254.9	956.8

5. 고혈압 및 치매 예방소재의 제품화기술 개발

가. 마늘 가공품 제조

1) 마늘의 매운맛 감소실험

동물실험결과 혈압강하 효과가 확인된 마늘의 1일 섭취량은 성인의 경우 마늘 8-10쪽에 해당되므로 매운맛을 감소시키지 않고는 유효량을 섭취하기 곤란하기 때문에 우선 매운맛을 감소시키기 위한 실험을 수행하였다. 마늘의 매운맛은 alliin이라는 전구체에 마늘내의 효소가 작용하여 매운맛을 내는 allicin이 생성되기 때문으로 알려져 있기 때문에 단시간의 열처리를 위하여 100℃ 가까운 수증기와 전자렌지에서 처리하여 매운 맛 소실 여부를 살펴보았다.

표 8에서 보면 껍질을 제거한 마늘인편을 열수증기로 10분정도 처리하거나 전자렌지에서 1분 정도 처리하면 섭취하기에 부담이 없을 정도로 마늘의 매운 맛이 제거되었다. 한편 마늘을 먼저 분쇄한 후 가열할 경우는 대부분의 매운맛이 잔류하였는데 이는 분쇄과정에서 효소와 기질의 접촉으로 매운 맛 성분이 생성되고, 일단 생성된 매운 맛 성분은 열처리에 의해 제거하기가 곤란하다는 점을 시사해 주고 있다. 한편 마늘을 식초나 간장에 절임할 경우 일정시간이 경과하면 매운맛이 상당량 감소하여 2개월 저장할 경우 부식으로 섭취하는데 불쾌하지 않을 정도까지 매운맛이 감소하였고 3개월이 경과하면 매운맛이 거의 소실되었다(표 9).

표 8. 열처리에 의한 마늘의 매운맛 소실

열처리	매운맛
100℃ 수증기 5분 100℃ 수증기 10분 100℃ 수증기 20분 100℃ 수증기 30분	70%정도 소실 거의 소실 완전 소실 완전 소실
전자렌지 30초 1분	60%정도 소실 거의 소실

표 9. 절임에 의한 마늘의 매운맛 변화

	1개월	2개월	3개월
식초절임	60%정도 소실	70%정도 소실	거의 소실
간장절임	50%정도 소실	60%정도 소실	거의 소실

2) 마늘 가공품 개발

가) 마늘 분말제품

마늘인편을 뜨거운 수증기로 10분간 열처리한 다음 적당하게 파쇄하여 50℃의 열풍으로 수분 15%내외까지 건조한 다음 분말화하여 마늘 분말제품을 제조하였다. 제품의 색상을 개선시키기 위해 여러 가지 가공조건을 도입할 수 있으나 기능성식품으로서 다량 섭취해야 하고 다양한 용도로 활용되기 위해서는 문제가 없는 것으로 조사되었다. 이렇게 제조된 마늘 분말은 육가공품, 소스류, 드레싱류, 스낵, 빵, 과자 등의 제조에 폭넓게 이용될 수 있으며 우리의 전통부식인 김치류나 국류에 필요한 양 만큼 첨가하여 용이하게 유효량을 섭취할 수 있을 것으로 판단되었다.

나) 마늘 식초절임

마늘을 식초에 절이면 매운맛이 감소되어 많은 양을 섭취할 수 있는 것이 밝혀져 마늘 인편 100g에 물 100g, 설탕 10-60g, acetic acid 6-7%함유 사과식초 100ml, 소금 0-10g을 배합시키고 원료마늘은 생마늘 또는 전자렌지로 30초-1분간 처리하여 3개월까지 실온에서 저장하면서 색상, 마늘향, 매운맛 및 조직감에 대한 특성을 조사해 보았다. 표10에서 보면 생마늘이나 약간의 열처리를 한 마늘을 원료로 사용할 경우 처음에 녹색 및 미약한 청색으로 변화하지만 열처리를 할 경우 녹색변이 발생하지 않았다. 그러나 저장 중 녹색이 절입액 중으로 용출되어 나오고 1개월 이후에는 볼 수 없게 될 정도로 탈색되어 별 문제가 없는 것으로 밝혀졌다. 간장절임의 경우도 간장에 부분적으로 용출되어 나오면서 간장색으로 착색되어 녹색변이 수용성 문제를 야기하지 않은 것으로 조사되었다. 마늘고유의 향은 식초향에 의해서 상당히 상쇄되었으며 열처리를 할 경우 마늘향이 크게 감소하였고 매운맛도 열처리에 의해 거의 소실될 뿐 아니라 생마늘로 초절임을 할 경우에도 저장기간이 1개월 이상 경과하면 점차 감소되는 것으로 밝혀져 고혈압에 유효한 양을 섭취하는데 지장이 없을 것으로 판단되었다. 그러나 열처리를 하여 초절임 또는 장절임을 할 경우 조직이 상당히 연화되어 마늘과 같지 않은 느낌을 주었다. 따라서 마늘 식초절임을 제조할 경우 열처

리는 불필요한 것으로 파악되었으며 기호성에 따라 설탕과 소금의 양은 다양하게 변화시킬 수 있을 것으로 보였다.

표 10. 초절임 마늘의 관능특성

시제품	배합					관능 특성			
	마늘 (g)	물 (ml)	설탕 (g)	식초 ¹⁾ (ml)	기타	색상	마늘향	매운맛	조직감
A	100	100	10	100	소금10g	녹변 ²⁾	강	강 ³⁾	적절
B	100	100	40	50	열처리30초 ⁴⁾	녹변	미약	미약	약간 무름
C	100	100	40	50	열처리1분	마늘색	소실	소실	무름
D	100	100	60	50	열처리1분	마늘색	소실	소실	무름

- 1) Acetic acid함량이 6-7%인 시판 사과식초
- 2) 전자렌지에서 가열처리 시간
- 3) 처음 녹변 후 점차 탈색되어 2개월 후 미약한 녹색
- 4) 1개월 후 부터 감소하기 시작하여 2개월 후에는 거의 소실

나. 당귀가공품 제조

치매의 예방소재로 나타난 당귀추출물의 1일 유효섭취량은 성인기준으로 약 6g에 해당하므로 먼저 당귀추출물의 제조조건을 조사하고 이어서 유효량을 일상적으로 섭취하기 용이하도록 몇 가지 시제품을 제조해 보았다.

1) 당귀추출물 제조

당귀를 물과 70% ethanol을 용매로 사용하여 가용성 추출물을 제조한 결과 표11과 같이 80℃ 물로 추출할 경우 당귀의 고형물 기준으로 추출 수율이 43.2%에 달하고 100℃에서 추출할 경우 45.5%로 약간 상승하였다. 70% ethanol로 추출한 경우 56.1%로 더욱 높아지고 한약추출기를 이용하여 100℃에서 압착 추출할 때도 55.8%의 높은 고형물 수율을 얻을 수 있었다. 이들 추출물 중 상당량은 sucrose일 것으로 보이며 나머지 성분에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

표11. 당귀의 추출조건별 추출수율

추출조건	추출수율(고형물기준%)
물, 80℃	43.2
물, 100℃	45.5
70% ethanol, 70℃	56.1
한약추출기, 100℃	55.8

표12. 당귀추출물의 관능 특성

추출조건	청징도	색상	냄새	맛	전체적기호도
물, 80℃	약간 혼탁	약한 갈색	당귀향 미약	당귀고유의맛 약	상
물, 100℃	약간 혼탁	약한 갈색	당귀향 미약	당귀고유의맛 약	중
70% ethanol, 70℃	투명	갈색	알콜취 강	당귀고유의맛 강	하
한약추출기, 100℃	혼탁	흑갈색	당귀향 강	당귀고유의맛 강	중

추출조건별 당귀추출물의 청징도를 살펴보면 표12에서 볼 수 있는 바와 같이 70% ethanol 추출액이 가장 투명하였으며 한약추출기를 이용할 경우 압착에 의해 적은 입자들이 많이 추출물에 이입되어 혼탁하였다. 한약추출기를 이용할 경우 추출물의 색상도 진한 흑갈색을 나타냈다. 당귀고유의 냄새를 조사한 결과 추출기를 이용한 시료가 가장 강했으며 70% ethanol 추출액은 알콜취에 의해 약하게 감지되었다. 쓴 맛과 떫은 맛은 70% ethanol 추출액이 가장 강하였으며 당귀고유의 맛은 70% ethanol 추출액과 추출기 사용 추출액에서 강하게 느껴졌으며 전체적인 기호도는 80℃ 추출액이 가장 양호하고 70% ethanol 추출액이 가장 낮게 나타났다.

2) 당귀가공품 제조

가) 당귀젤리의 제조

다양한 시제품 제조실험을 실험실 규모로 수행한 결과 gelatin 1.8g을 물 10ml에 넣어 5분간 불린 후 가열하여 녹인 다음 당귀추출액 (16° Bx) 38ml을 가하여 혼합하고 100℃정도까지 가열, 살균한 후 냉각하여 당귀젤리를 제조할 수 있었다.

나) 당귀 양갱 제조

한천 2g을 150ml의 물에 넣어 30-60분간 불린 다음 여기에 설탕 20g과 당귀추출액 (16° Bx) 6ml을 가하여 전체의 양이 1/4가량 감소할 때까지 끓인 다음 60℃정도까지 식힌 후 성형틀에 부어서 굳히면 양갱제품이 제조된다.

다) 당귀묵 제조

시판 목가루(도토리묵) 60g에 당귀추출액 (7° Bx) 86ml과 물을 514ml를 넣고 잘 혼합한 다음 가열하여 끓기 시작하면 가열정도를 낮추어 20-30분간 뜸을 들이면 당귀첨가묵이 제조될 수 있다.

라) 당귀죽 제조

흔히 애용되고 있는 죽 가운데 참치죽, 잣죽, 북어죽, 쇠고기죽, 진미죽을 선택하여 각각의 죽 1인분에 당귀고형분 6g을 함유한 당귀추출액 (16° Bx) 43ml를 첨가시켜 보았다.

마) 당귀과일음료 제조

당귀차 형태는 당귀의 맛과 향이 너무 강하여 1일 6g의 양을 섭취하기가 용이하지 않아 기호성이 좋은 각종 과일류와 당귀추출액을 혼합하여 당귀혼합 과일음료를 제조해 보았다.

포도주스가 당귀의 쓴맛을 완화시키는데 가장 적합한 것으로 나타나 당귀 추출액

72ml에 포도주스를 9ml, 18ml, 36ml, 54ml 첨가한 결과 9ml첨가는 당귀의 쓴맛을 줄이는 데 미흡하였고 18ml가 최소첨가용량으로 밝혀졌으며 36ml이상 첨가시에는 당귀의 향보다 포도의 맛이 더욱 강하게 느껴졌다. 사과주스 및 토마토 주스 첨가도 당귀의 쓴맛을 상당히 완화시킬 수 있었다.

이들 당귀가공품의 관능특성을 비교한 결과(표13) 당귀젤리가 노인용 식품형태로 가장 바람직한 것으로 조사되었으며, 과일주스를 혼합할 경우 포도과즙이 당귀의 쓴맛과 향을 완화시키는데 가장 적합한 것으로 나타났다. 따라서 성인이 하루에 섭취해야 할 당귀추출물의 양을 포함한 젤리를 제조하기 위해서 gelatin 1.8g, 설탕 10g, 당귀 (16° Bx)38ml, 포도과즙 20ml를 사용하여 기호성이 양호한 당귀젤리를 제조할 수 있었다.

표 13. 당귀 가공품의 관능특성

제 품 명	첨가재료	관능적 특성 기술
당귀젤리	gelatin	치매예방을 위한 노인용 기능성식품임을 고려할 때 씹는 정도도 적당하고 맛 또한 약간 보완한다면 좋은 제품이 되리라 생각된다.
당귀양갱	한천	
당귀 목	목 분말가루	당귀 추출액을 첨가시킨 목의 경우 당귀의 쓴맛이 그대로 나타났다.
당귀 죽	죽	갓죽과 쇠고기 죽에 첨가시킨 당귀 추출액의 기호도가 높았다.
당귀과일음료	사과쥬스	사과의 당성분과 산미가 조화로운 맛을 냈다.
당귀과일음료	배쥬스	시원한 독특한 맛이 있으나 당귀의 쓴맛을 상쇄시키지는 못하였다. 또한 시간경과 후 배의 침전물이 생성되어 당귀 추출액과 혼합되지 않았다.
당귀과일음료	당근쥬스	당귀의 쓴맛을 감소시키지 못하고 밋밋한 맛을 나타내었다.
당귀과일음료	포도쥬스	포도자체의 신맛성분이 잘 조화를 이루어 당귀의 쓴 맛과 향을 감소시켰다.
당귀과일음료	귤쥬스	특별한 맛을 느끼지 못하였고 당귀와 귤의 맛이 조화롭지 못하다.
당귀과일음료	토마토쥬스	토마토의 시큼한 맛과 당귀추출액의 혼합된 맛이 조화로웠다.

제 4절 결론

1. 생약소재로 부터 고혈압 예방소재의 탐색

생약소재로서 건강식품 또는 기능성식품소재로서 활용가능하다고 판단되는 80 여종의 시료를 구입하여 70% ethanol로 추출한 다음 동결건조한 시료를 사용하여 혈압 상승효소인 Angiotensin converting enzyme(ACE)의 활성을 저해하는 정도를 조사한 결과 파극, 단삼, 복분자, 숙단, 우슬, 측박, 현초, 건칠, 감초 및 송절 등이 1차 선정되었고 이어서 건조추출물의 수율과 식품소재로서의 맛 등을 고려하여 감초, 두충, 상백피 및 우슬을 2차 동물실험을 위한 시료로 선정하였다.

2. 고혈압 및 치매예방소재의 제품화기술 개발

고혈압 억제소재로 마늘, 표고버섯 및 두충이 유효한 것으로 나타났고 치매억제소재로서 당귀가 효능이 있는 것으로 밝혀져 이들 중 다량 섭취가 용이하지 않은 마늘과 당귀에 대해서 다량 섭취할 수 있는 제품개발 방안이 제시되었다.

○ 마늘 가공품의 개발

마늘이 혈압강하 효과를 나타내기 위해서는 식이량의 3%량이 섭취되어야 하므로 이를 위해서는 마늘 고유의 매운맛이 상당히 제거되어야 한다. 마늘을 수증기로 10분 정도 가열처리하거나 전자렌지로 1분 내외 처리하여 매운맛의 생성효소를 불활성화시킨 다음 마쇄, 건조하여 분말제품을 제조한 다음 이를 다양한 형태로 섭취하거나 또는 마늘의 매운맛이 식초절임 및 간장 절임시 감소하므로 약 2개월 이상 절임 후 부식으로 섭취하는 방법이 적당할 것으로 조사되었다.

○ 당귀가공품의 개발

당귀가 치매예방 효능을 갖기 위해서는 성인의 경우 하루 6g의 추출물 섭취가 요구되므로 기존의 당귀차 형태로는 냄새와 고유의 맛이 너무 강하여 이를 완화하는 방법이 필요하다. 80-100℃의 물로 1시간 동안 추출하여 건물기준으로 40%이상의 높은 수율로 추출물을 제조할 수 있었고, 이 추출물을 활용하여 기호성이 좋은 젤리, 양갱 및 과일혼합음료를 제조할 수 있었다.

참고문헌

김광옥 : 관능검사의 발전 및 이용 분야. *식품과학과 산업*, 24(2), 61-90(1991)

김태진, 윤호동, 이두석, 장영순, 서상복, 염동민 : 담수어 열수추출물 및 효소가수 분해물의 Angiotensin 1 전환효소 저해작용. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 25(5), 871-877(1996)

도정룡, 김선봉, 박영호, 김동수 : 기호음료의 성분의 Angiotensin-1 저해작용. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25(5), 456-460(1993)

손동화 : 건강기능성 식품 펩타이드 및 그 응용. *식품과학과 산업*, 30(1), 22-29(1997)

신현경 : 기능성 식품의 개발 및 연구동향. *식품과학과 산업*, 30(1), 2-13(1997)

안은영, 한지숙, 신동화 : 상백피 추출물중 *Listeria monocytogenes* 증식억제 물질의 분리 및 효과. *Korean J. Food. Sci. Technol.*, 29(6), 1236-1240(1997)

유리나, 박수아, 정대균, 남희섭, 신재익 : 대두 가수분해물에서 분리한 UF-peptide가 *in vivo*에서 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압 강하에 미치는 영향. *한국영양과학회지*, 25(6), 1031-1036(1996)

전희정, 백재은 : 처리법을 달리한 마늘 첨가식이 자발성 고혈압쥐의 혈액에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, 6-26(1), 103-108(1997)

정명현, 박정완 : 혈압강하제 국산자원 생약의 혈압강하 성분에 관한 연구 (Ⅲ): 한국산 두충의 가토 혈압에 미치는 영향. *생약학회지* 6(1), 39, 1975

조영제, 안봉전, 최 청 : 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물의 angiotensin converting enzyme 저해효과. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 25(3), 238-242(1993)

허우덕, 하재호, 석호문, 남영중, 신동화: 김치의 저장중 향미 성분의 변화, *한국식품과학회지*, 20, 511 (1988)

Adams R. J. : *Experimental Surgery and Physiology: Induced Animal Models of Human Disease. Williams & Wilkins.* (1988)

Adamu I., Joseph P. K., and Augusti K. T. : Hypolipidemic action of onion and garlic unsaturated oils in sucrose fed rats over a two-month period. *Experientia*, 38, 899-901(1982)

A.O.A.C. international: *Methods of Analysis for Nutrition Labeling*, Sullivan, D. M. and Carpenter, D.E. (Ed.), International Virginia, p.455 (1993)

Block E. and Ahmad S. : (E,Z)-Ajoene: A Potent Antithrombotic Agent from Garlic. *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 8295-8296(1984)

Bordia A. : Effect of Garlic on Human Platelet Aggregation *In Vitro*.

Atherosclerosis, 30, 355-360(1978)

Bordia A. and Bansal H. C. : Essential Oil of Garlic in Prevention of Atherosclerosis. *The Lancet*, 29, 1491-1492(1973)

Brunner H. R., Gavras H. and Waeber B.1 : Oral angiotensin-converting enzyme inhibitor in long-term treatment of hypertensive patients. *Annals of Internal Medicine*, 90(1), 19-23(1979)

Cheung H. S., Wigel F. L., Ondetti M. A., Sabo E. F. and Cushman D. W. : Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401-407(1980)

Chi M. S., Koh E. T., and Srtelling T. J. : Effect of Garlic on Lipid Metabolism in Rats Fed Cholestrol or Lard. *J. Nutr.*, 112, 241-248(1982)

Cushman D. W. and Cheung H. S. : Spectrophotometric assay properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648(1971)

Deyama, T. : The Constituents of *Eucommia ulmoides* OLIV. I. Isolation of (+)-Medioresinol Di-*O*- β -D-glucopyranoside. *Chem. Pharm. Bull.*, 31(9), 2993-2997(1983)

Friedewald W. T., Levy R. I. and Frederickson D. S. : Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of

the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 28(6), 499-502(1972)

Greenlee W. J., Allibone P. L., Perlow D. S., Patechett A. A., Ulm E. H. and Vassil T. C. : Angiotensin-converting enzyme inhibitors: Synthesis and biological activity of acyl tripeptide analogues of enalapril. *J. Med. Chem.*, 28, 434-442(1985)

Hattori M., Che Q.M., Gewali M.B., Nomura T., Tezuka Y., Kikuchi T., Namba T.: Studies on du-zhong leaves(III) Constituents of the leaves of *Eucommia ulmoides*(I). *Shoyakugaku Zasshi*, 42(1), 76-80(1988)

Hazato T. and Kase R. : Isolation of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor from Porcine Plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 3139(1), 52-55(1986)

Jain R. C. : Effect of garlic on serum lipids, coagulability and fibrinolytic activity of blood. *Letters To The Editor*, 1380-1381

Kabir Y., Yamaguchi M. and Kimura S. : Effect of shiitake(*Lentinus edodes*) and Maitake(*Grifola frondosa*)Mushrooms on Blood Pressure and Plasma Lipids of Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Nutr. Sci. vitaminol.*, 33, 341(1987)

Kendler B. S. : Garlic(*Allium sativum*) and Onion(*Allium cepa*): A Review of Their Relationship to Cardiovascular Disease. *Preventive Medicine*, 16, 670-685(1987)

Kohmura M., Nio N. and Ariyoshi Y. : Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of human k-casein. *Agric. Biol. Chem.*, 54(3), 835-836(1990)

Lanzillo J. J. and Fanburg B. L. : Angiotensin I Converting Enzyme from Human Plasma. *Biochemistry*, 16, 5491-5495(1977)

Lu M., and Gillies L. : Antihypertensive effects of perindopril treatment in adult spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Cardiol.*, 13(9), 831-835(1997)

Linz W., Wiemer G. and Schaper J. : Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, left ventricular hypertrophy and fibrosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 147, 89-97(1995)

Maruama S. and Suzuki H. : A Peptide Inhibitor of Angiotensin I Conversion Enzyme in the Trypic Hydrolysate of Casein. *Agric. Biol. Chem.*, 46(5), 1393-1394(1982)

Maruyama S., Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N. and Taraka H. : Studies on the Active Site and Antihypertensive Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors Derived from Casein. *Agric. Biol. Chem.*, 51(6), 1581-1586(1987)

Matsui T., Matsufuji H., Seki E., Osjima K., Nakashima M. and Osajima Y. : Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *bacillus licheniformis*

alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(6), 922-925(1993)

Matsumura N., Mikio F., Takeda Y., Sugita K., and Shimizu T. : Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(5), 695-697(1993)

Mukhopadhyay A. K. and Raizada M. K. : Tissue renin-angiotensin systems-Current concepts of local regulators in reproductive and endocrine organs. *Advances in experimental medicine and biology*, 377, 1995

Pektov, U. : Plants with hypotensive, antiatheromatous and coronarodilating action. *Amer. J. chinese Med.*, 7, 197-236 (1979)

Rhyu M. R., Nam Y. J. and Lee H. Y : Screening of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in cereals and legumes. *Foods and Biotechnology*, 5(4), 334-337(1996)

Salas I., Brenes, J. R. and Morales O. M. : Antihypertensive effect of *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) leaf extract on rats. *Rev Biol Trop*, 35(1), 127-130 (1987)

Shoentan A., Auguisti K. T., and Joseph P. K. : Hypelipidemic effects of garlic oil in rats fed ethanol and high lipid diet. *Experientia*, 40, 261-263(1984)

Sodimu O., Joseph and Augusti : Certain biochemical effects of garlic oil on rats maintained on high fat-high cholesterol diet. *Experientia*, 40, 78-80(1984)

Suh H. J., Cho S. J., Whang J. H., Lee H., and Yang H. C. : Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate. *Foods and Biotechnology*, 6(2), 122-124(1997)

Waters AccQ-Tag Amino Acid Analysis System: Operator's Manual, (1993)

Yamamoto N., Akino A. and Takano T. : Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58(4), 776-778(1994)

Yamanaka K., Takehara N., Murata K., Banno and Sato T. : Steady-state Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Imidaprilat, an Active Metabolite of Imidapril, a new Angiotensin-converting Enzyme Inhibitor in spontaneously Hypertensive Rats, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(11), 1234-1237(1996).

Yokoyama K., Chiba H. and Yoshikawa M. : Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(10), 1541-1545(1992)

Zhang L., Edwards D. G., and Berecek K. H. : Effect of Early Captopril Treatment and its Removal on Plasma Angiotensin Converting Enzyme(ACE)

Activity and Arginine Vasopressin in Hypertensive Rats(SHR) and Normotensive Rats(WKY). *Clin. and Exper. Hypertension*, 18(2), 201-226(1996)

카와키시 순로 : 생물화학실험법 : 식품 중의 생체기능조절물질 연구법. 한림원, 1-135(1996)