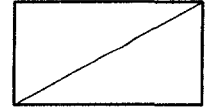


최 종
연구보고서



농산자원으로부터 심혈관 질환 예방, 치료 활성 신소재 개발에 관한 연구

Development of New Bioproducts
for Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases
from Agricultural Resources

생명공학연구소

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산자원으로부터 심혈관 질환 예방, 치료 활성 신소재 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 년 1 월 5 일

주관연구기관명 : 생명공학연구소
총괄연구책임자 : 복 성 해
연 구 원 : 정 태 속
연 구 원 : 이 준 성, 안 병 태
연 구 원 : 이 은 속, 이 새 분
연 구 원 : 현 병 화
연 구 원 : 이 철 호, 최 양 규
협동연구기관명 : 경북대학교
협동연구책임자 : 박 용 복, 최 명 속
협동연구기관명 : 충남대학교
협동연구책임자 : 배 기 환

여 백

요 약 문

I. 제 목

농산자원으로부터 심혈관 질환 예방, 치료 활성 신소재 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구 개발의 최종 목표

심혈관 질환 예방·치료에 활성을 보이는 생체활성물질을 함유하는 농작물, 특용작물, 약용작물, 산채, 과채류 등을 탐색하고 이들의 대량생산 보급기술을 추진하며 이들로부터 유용물질 성분들을 분리·정제하며 기능성 건강증진용 성분, 건강식품성분, 약용 성분원료로 개발하여 농가소득증대, 농촌경제 활성화, 생약재 수입 대체 및 수출산업 창출에 기여한다.

2. 연구개발의 중요성

경제적 중요성으로 볼 때 전체 의약품 시장의 15%를 심장순환기 질환 치료제가 차지할 만큼 시장규모가 방대하고 콜레스테롤 강하제 시장은 연간 20-30%의 급성장을 하고 있어 경제적으로 중요한 분야이다. 사회적으로 볼 때 선진국에서 사망률의 30-40%가 순환기계 질환에 의한 것으로 국민보건상 엄청난 중요성이 있다고 할 수 있다. 기술적으로 볼 때 본 과제의 성공적인 수행은 우리나라 식품의약 개발 기술의 선진화에 크게 기여할 수 있을 것이다.

심장마비, 동맥경화증, 뇌졸중 등 순환기 질환은 만성 성인병으로서 현대 과학이 발달하고 수많은 치료제가 계속 나오고, 심장병 치료 약품시장이 매년 10% 이상 성장하고 있음에도 불구하고 전혀 개선의 여지가 보이지 않고 환자수가 계속 증가하고 있다. 45세 이상 고령층에 많은 이 질병은 주요발병원인으로 고혈압, 흡연, 비만증, 고지혈증, 당뇨 등이 지적되고 있으며, 미국에서만만도 연간 90 만명이 타격을 받고 있으며 15만명이 사망하는 것으로 알려져 있다. 전세계적으로 심장순환기 질환은 전체 사망률의 30%를 웃돌고 있고, 한국에서는 특히 동맥경화, 뇌졸중, 중풍 등이 심각한 사

회문제로 대두되고 있다.

또한 지금까지 알려져 온 것처럼 심장순환기 질환인 고지혈증 및 동맥경화증은 일단 발병하면 완전한 치료는 대단히 어렵다는 점을 감안할 때, 치료보다는 예방에 역점을 두고, 약물 독성이 없으며, 안전하여 장기간 복용이 가능한 심혈관 질환 예방, 치료 활성 신소재의 개발이 절실히 요구되고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

구분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (1995-1996)	생체활성 신기능 물질 탐색	- 약리활성물질, 기능성물질 함유 특용작물, 농수산 자재 및 산채 탐색 - 약리활성물질 검색법 확립 - <i>In vivo</i> 활성검색법 확립 - 물질의 분리정제 및 구조결정 시도
2차년도 (1996-1997)	생체활성물질의 분리, 정제 및 구조결정	- 각종 심혈관질환의 예방, 치료 활성물질 분리정제 및 구조결정 - 대량 스크리닝 system 가동 - <i>In vivo</i> 활성 검색 - 활성성분의 응용 연구 시작
3차년도 (1997-1998)	기능성 물질의 생산기술 및 <i>in vivo</i> 실험	- 기능성 물질의 대량생산, 분리, 정제 및 구조결정 - 기능성 물질을 이용한 시제품 제조 - 기능성 물질의 세계 특허출원
4차년도 (1998-1999)	기능성 물질의 대량생산 체계 확립	- 대량생산, 분리정제기술 - 기능성 물질 함유 특용작물 개발 보급연구 - 대량생산 system 연구 - 동물, 독성실험 완결 - Pilot plant 가동 - 제품 등록 - 산업체 기술 이전

제 1 위탁과제(경북대학교)의 연구개발 내용 및 범위

1. 흰쥐를 이용한 감귤피와 대추 추출물의 *in vivo* 역가 실험
2. *In vitro* test를 통한 시험물질들의 효소 저해활성 점검
3. High cholesterol diet를 급여한 흰쥐를 사용하여 귤피추출물과 그 구성성분에 대한 *in vivo* 역가 실험 수행

4. High cholesterol 과 high fat diet를 동시 급여한 흰쥐를 대상으로 글피추출물과 그 구성성분에 대한 *in vivo* 역가 실험
5. 대추추출물의 효능 및 naringin과 병합투여 효능확인을 위한 동물실험
6. Citrus bioflavonoid와 인삼이 vitamin E 수준이 식이에 보충된 경우 고지혈증 예방효과에 미치는 영향분석
7. Cinnamate derivatives와 타 bioflavonoid들 (rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, tannin)의 혈중 콜레스테롤 강하기능 분석

제 2 위탁과제(충남대학교)의 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
제1차년도 (1995-1996)	자원확보 및 순환기약품 개발 가능성 타진	순환기 농산물(생약) 조사와 선정 감굴 유효성분 추출조건 확정
제2차년도 (1996-1997)	신규 순환기 의약품 창출을 위한 성분조사	오미자, 산사나무 잎의 성분연구
제2차년도 (1997-1998)	자원확보 및 수입대체 가능성 타진	산사나무열매(산사자) 성분연구 감굴 및 근연식물 열매의 hesperidin 함량조사
제4차년도 (1998-1999)	산업화에 대비한 원료확보, 채취시기 결정	성숙기에 있어서 감굴의 유효성분 함량변화

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. CETP 저해제 탐색 : 약리활성물질 스크리닝 방법으로 CETP 저해제 탐색법을 확립하였다. 90여종의 식품재료, 농산물재료 등을 이용하여 콜레스테롤 전이단백질 저해활성 성분을 탐색하는데 성공하였다. 이중 15개의 농작물 등은 콜레스테롤 전이단백질 저해활성을 보여주었다. CETP 저해활성을 나타내는 시료중에서 linoleic acid(CETP IC₅₀ value 29.3 μM)나 linolenic acid(CETP IC₅₀ value 35.7 μM)를 포함하는 의사 CETP 저해물질을 선별하여 배제하였다. 생강으로부터 용매추출, 실리카겔 column, HPLC를 이용하여 gingerol계의 물질인 [10]-Dehydrogingerdione과 [6]-Dehydrogingerdione을 분리하였으며, 콜레스테릴 에스테르 전이단백질(CETP) 저

해활성의 측정을 측정한 결과, [10]-Dehydrogingerdione의 IC₅₀ 치는 35 μ M이고, [6]-Dehydrogingerdione의 IC₅₀ 치는 120 μ M이었다.

나. 감귤과피로부터 Flavonoids 대량 추출 방법의 확립 : 제주도산 감귤껍질을 그늘에서 건조하여 분말화한 시료를 30-90% ethanol 용액, NaOH 용액, Ca(OH)₂ 용액으로 추출하고, HPLC를 이용하여 함유하고 있는 Naringin과 Hesperidin의 함량을 조사한 결과, 알카리 처리 방법이 효율적인 방법이 될 수 있음을 알 수 있고, 고순도를 얻기 위해 Ca(OH)₂에 의한 침전물 생산 방법이 우수하여 대량생산에 응용될 수 있다.

제주도에서 구입한 재래 감귤인 산물, 스타치, 청귤, 병귤, 온주, 당유자, 하귤, 한라봉을 대상으로 위와 같은 방법으로 flavonoids를 추출하여 naringin과 hesperidin의 함량을 조사한 결과 수확기에 다른 naringin과 hesperidin의 함량에 큰 차이가 있는 것으로 나타났다.

다. 토끼를 이용한 flavonoids 투여에 따른 고지혈증 및 동맥경화 예방 및 치료 활성 검정 : 체중 2.5~2.6 kg의 3 개월령 뉴질랜드 백색종 (New Zealand White)의 건강한 수컷 토끼를 이용하여 1% 고콜레스테롤 식이와 함께 naringin, hesperidin 및 naringin metabolite를 병행 투여하여 심장순환기 질환의 예방 및 치료 효과를 관찰하고자 하였다. 혈액화학 분석을 통한 혈중 콜레스테롤 및 지방의 변화, 대동맥내 지방선의 관찰, 간조직내 지방 함유 비정상 세포를 분석한 결과, 총콜레스테롤은 JBB-6가 50%, JBB-10이 46% 감소된 좋은 결과를 얻었고, 지방성 침착은 대조군과 비교하여 전반적으로 유의성 있게 감소된 양상을 나타내어 시험물질 모두 혈관내 콜레스테롤 침착을 효과적(특히 JBB-8, JBB-12)으로 억제하는 것으로 판단되었고, JBB-7, 10, 11, 14의 경우에는 대조군에 비하여 유의하게 낮은 간세포의 손상율을 보여 간보호 효과가 있음을 암시하였다. JBB-8 및 JBB-12를 투여한 군의 liver microsomal ACAT 활성도가 20-25% 정도 감소하였다. 이로부터 naringin, hesperidin을 비롯하여 naringin metabolite들의 동맥경화 및 고지혈증 예방 및 치료 효과를 관찰하였다.

라. 진피추출액의 고혈압쥐에 대한 혈압 및 심박수 측정 : 진피 Ethanol extract의 경우 사용된 3 종의 고혈압 쥐에서 혈압상승에 연이은 혈압강하작용의 이중효과를 보였으며, 비마취 DOCA/salt 고혈압쥐에서 가장 큰 potency 및 두드러진 경향이 관찰되었다. 대조물질인 Hesperidin의 경우도 DOCA/salt 고혈압쥐에서 현저한 용량의 존성의 지속적인 혈압강하작용을 보였으며 RHR에서도 혈압강하작용의 경향을 보였다.

이상의 결과로 보아 진피 Ethanol extract의 경우 이노작용에 의한 혈압강하작용이 기대되고 분별추출 및 단일물질분리에 의한 추가실험과 장기 투여 protocol에 의한 생리활성의 추가규명을 통해 고혈압 및 순환계 질환 치료 작용을 보다 명확하게 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

마. 심혈관 질환 예방치료 활성성분 및 물질의 *in vivo* 활성검정 연구 :

- 감귤피 추출물의 flavonoid 성분인 hesperidine, hesperetin, naringin, naringenin 의 투여는 동물실험에서 강력한 혈중 지질저하 작용을 나타내었다.
- Hesperidine, hesperetin, naringin, naringenin의 콜레스테롤 저하작용 기작은 간의 HMG-CoA reductase 와 ACAT 활성도 저해를 통하여 증재되었다.
- 고지혈증 조건에서 naringin의 콜레스테롤 저하작용은 HMG-CoA reductase inhibitor인 Lovastatin의 작용보다 우수하게 나타났다.
- 감귤피 엑기스와 대추분말을 양파, 마늘 및 생강과 함께 양념소스로 제조하여 고콜레스테롤혈증 흰쥐에 투여한 경우 혈중 콜레스테롤 저하기능을 보였다.
- 식이 비타민 E 수준이 낮을 경우 naringin과 hesperidin의 보충은 식이에 부족된 Vit. E의 체내작용을 부분적으로 보조 또는 대체하는것으로 평가되었다.
- Cinnamate와 그 유도체(4-hydroxy hydrocinnamate, 3,4-dihydroxy cinnamate), rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, 및 tannin의 투여는 고지혈증 동물의 지질대사를 개선시켜 혈중 지질농도를 정상화 또는 저하시키는 작용이 있다.

바. 심혈관질환의 예방, 치료용 활성물질을 함유한 농산물의 탐색 및 개발에 관한 연구 :

- 순환기 치료생약과 약용식물 조사와 선정, 귤피의 유효성분 추출조건 확립
- 오미자 및 산사나무잎의 성분 분리: 오미자와 산사나무는 순환기 치료 생약으로 개발 가능성이 높은 점에 착안하여 유효성분을 분리하고 화학구조를 규명하였다. 오미자로부터는 lignan 계통의 물질을 대량으로 분리할 수 있는 방법을 확립하였고, 산사나무의 잎으로부터는 천연에 새로운 물질을 분리, 화학구조를 규명하였다.
- 산사자의 성분 및 재래종 귤피류의 hesperidin과 naringin의 함량조사: 순환기 치료제로 개발 가치가 높은 산사자의 성분들을 연구하여 새로운 물질 2개를 분리, 화학구조를 규명하였다. hesperidin을 포함하는 플라보노이드 성분은 감귤 뿐만 아니라 운향과에 속하는 나무들의 열매에 어느 정도 이 물질이 함유하는

가를 조사하였다. 감귤껍질의 약효성분인 hesperidin의 함량을 HPLC법으로 정량하였고, 감귤과 가까운 식물이며 제주도에서 생산되는 재래종인 인창귤, 사두감, 제주레몬, 유자들과의 hesperidin 함량을 비교한 결과, 인창귤의 껍질에는 2.50%, 사두감 껍질에는 3.56%가 함유되어 있었다. 이러한 결과로부터 인창귤과 사두감도 자원으로 활용할 수 있음을 확인하였다.

- 성숙기에 있어서 귤피류의 성분변화 조사: 9월, 10월, 그리고 11월은 감귤 및 근연식물의 열매들이 성숙하는 시기이다. 이 시기에 있어서 약효성분들이 어떻게 변하는가를 HPLC로 정량하여 조사하였다. 이러한 실험은 유효성분들을 언제 채취하는 것이 가장 효율적인가를 판단할 수 있는 근거가 되었다. Hesperidin 함량은 9월에는 5.4%, 10월에는 4.5%, 11월에는 3.0%이었다. 그러므로 9월에 덜 익은 감귤도 자원으로 활용할 수 있다고 판단된다.

사. 논문 발표 및 특허출원, 등록

본 연구과제를 수행하면서 국외논문 6 편, 국내 논문 1 편을 발표하였으며, 미국특허 3 건이 등록되었고, 국제특허 10 건, 국내 특허 32 건을 출원하였다.

2. 연구결과 활용 계획 및 건의

감귤피분말, 감귤 flavonoids를 함유하는 식품의약(Nutraceutical) 또는 건강보조식품을 개발하여 산업화하고자 하며, 한편으로 국내 타 식품업체를 통한 신제품 응용 개발이 가능할 것이다.

감귤 부산물 등 농산부산물을 이용하여 고부가가치 제품 생산의 가능성을 제시함과 동시에, 제주도 감귤협동조합 등과 연계하여 무공해 감귤을 생산하고 현지 추출 공장 설립을 통해 원료 조달 및 가공을 자체적으로 수행하고자 한다.

본 연구팀이 출원한 국내 및 해외 특허를 바탕으로, 감귤류의 생산과 소비가 국내에 비해 월등하게 많은 미주지역의 외국업체에 대한 기술이전을 통한 사업화가 추진 중이다.

동물실험을 통해 감귤피분말, 감귤피 추출액, 감귤 flavonoids의 고지혈증, 동맥경화증 및 간기능 보호작용이 있음을 확인하였다. 따라서 고지혈증 및 동맥경화증 환자들을 대상으로 한 임상 연구에서 지속적인 재평가가 이루어지면 조기 산업화가 가능하다.

주관연구기관과제

농산자원으로부터 심혈관 질환 예방, 치료
활성 신소재 개발에 관한 연구

여 백

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산자원으로부터 심혈관 질환 예방, 치료 활성 신소재 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 년 1 월 5 일

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 북 성 해

연 구 원 : 정 태 속

연 구 원 : 이 준 성, 안 병 태

연 구 원 : 이 은 속, 이 세 봄

연 구 원 : 현 병 화

연 구 원 : 이 철 호, 최 양 규

여 백

요 약 문

I. 제 목

농산자원으로부터 심혈관 질환 예방, 치료 활성 신소재 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구 개발의 최종 목표

심혈관 질환 예방·치료에 활성을 보이는 생체활성물질을 함유하는 농작물, 특용작물, 약용작물, 산채, 과채류 등을 탐색하고 이들의 대량생산 보급기술을 추진하며 이들로 부터 유용물질 성분들을 분리·정제하며 기능성 건강증진용 성분, 건강식품성분, 약용 성분원료로 개발하여 농가소득증대, 농촌경제 활성화, 생약재 수입 대체 및 수출산업 창출에 기여한다.

2. 연구개발의 중요성

경제적 중요성으로 볼 때 전체 의약품 시장의 15%를 심장순환기 질환 치료제가 차지할 만큼 시장규모가 방대하고 콜레스테롤 강하제 시장은 연간 20-30%의 급성장을 하고 있어 경제적으로 중요한 분야이다. 사회적으로 볼 때 선진국에서 사망률의 30-40%가 순환기계 질환에 의한 것으로 국민보건상 엄청난 중요성이 있다고 할 수 있다. 기술적으로 볼 때 본 과제의 성공적인 수행은 우리나라 식품의약 개발 기술의 선진화에 크게 기여할 수 있을 것이다.

심장마비, 동맥경화증, 뇌졸중 등 순환기 질환은 만성 성인병으로서 현대 과학이 발달하고 수많은 치료제가 계속 나오고, 심장병 치료 약품시장이 매년 10% 이상 성장하고 있음에도 불구하고 전혀 개선의 여지가 보이지 않고 환자수가 계속 증가하고 있다. 45세 이상 고령층에 많은 이 질병은 주요발병원인으로 고혈압, 흡연, 비만증, 고지혈증, 당뇨 등이 지적되고 있으며, 미국에서만도 연간 90만명이 타격을 받고 있으며 15만명이 사망하는 것으로 알려져 있다. 전세계적으로 심장순환기 질환은 전체 사망률의 30%를 웃돌고 있고, 한국에서는 특히 동맥경화, 뇌졸중, 중풍 등이 심각한 사

회문제로 대두되고 있다.

우리나라는 오래 전부터 동의보감 등에서 볼 수 있듯이 생약성분함유 약용식물을 이용한 민간요법이 개발되었으며 이들의 연구자료를 이용하여 현대적인 분석기술 및 생명공학기술을 도입할 경우 신규 고성능 활성물질을 자생의 농산물 및 식물들로부터 추출이 가능하다. 또한 유럽, 미국 등 서양에서 청정농산물에 관한 관심, 건강에 관한 관심이 급증하여 천연물을 이용한 건강보조식품의 소비량이 급증하고 있으며, 최근 미국에서는 FDA에서 식물성분 추출액 및 이들 성분의 이용에 관해 공식으로 인정할 움직임이며 건강유지, 질병예방용 기능성 생물소재시장이 크게 확대될 전망이다.

또한 지금까지 알려져 온 것처럼 심장순환기 질환인 고지혈증 및 동맥경화증은 일단 발병하면 완전한 치료는 대단히 어렵다는 점을 감안할 때, 치료보다는 예방에 역점을 두고, 약물 독성이 없으며, 안전하여 장기간 복용이 가능한 심혈관 질환 예방, 치료 활성 신소재의 개발이 절실히 요구되고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (1995-1996)	생체활성 신기능 물질 탐색	- 약리활성물질, 기능성물질 함유 특용작물, 농수산 자재 및 산체 탐색 - 약리활성물질 검색법 확립 - <i>In vivo</i> 활성검색법 확립 - 물질의 분리정제 및 구조결정 시도
2차년도 (1996-1997)	생체활성물질의 분리, 정제 및 구조결정	- 각종 심혈관질환의 예방, 치료 활성물질 분리정제 및 구조결정 - 대량 스크리닝 system 가동 - <i>In vivo</i> 활성 검색 - 활성성분의 응용 연구 시작
3차년도 (1997-1998)	기능성 물질의 생산기술 및 <i>in vivo</i> 실험	- 기능성 물질의 대량생산, 분리, 정제 및 구조결정 - 기능성 물질을 이용한 시제품 제조 - 기능성 물질의 세계 특허출원
4차년도 (1998-1999)	기능성 물질의 대량생산 체계 확립	- 대량생산, 분리정제기술 - 기능성 물질 함유 특용작물 개발 보급연구 - 대량생산 system 연구 - 동물, 독성실험 완결 - Pilot plant 가동 - 제품 등록 - 산업체 기술 이전

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. CETP 저해제 탐색 :

약리활성물질 스크리닝 방법으로 CETP 저해제 탐색방법을 확립하였다.

90여종의 식품재료, 농산물재료 등을 이용하여 콜레스테롤 전이단백질 저해활성 성분을 탐색하는데 성공하였다. 이중 15개의 농작물 등은 콜레스테롤 전이단백질 저해활성을 보여주었다. CETP 저해활성을 나타내는 시료중에서 linoleic acid(CETP IC₅₀ value 29.3 μM)나 linolenic acid(CETP IC₅₀ value 35.7 μM)를 포함하는 의사 CETP 저해물질을 선별하여 배제하였다.

생강으로부터 용매추출, 실리카겔 column, HPLC를 이용하여 gingerol계의 물질인 [10]-Dehydrogingerdione과 [6]-Dehydrogingerdione을 분리하였으며, 콜레스테롤 에스테르 전이단백질(CETP) 저해활성의 측정을 측정한 결과, [10]-Dehydrogingerdione의 IC₅₀ 치는 35 μM이고, [6]-Dehydrogingerdione의 IC₅₀ 치는 120 μM이었다.

나. 감귤과피로부터 Flavonoids 대량 추출 방법의 확립 :

제주도산 감귤껍질을 그늘에서 건조하여 분말화한 시료를 30-90% ethanol 용액, NaOH 용액, Ca(OH)₂ 용액으로 추출하고, HPLC를 이용하여 함유하고 있는 Naringin과 Hesperidin의 함량을 조사한 결과, 알카리 처리 방법이 효율적인 방법이 될 수 있음을 알 수 있고, 고순도를 얻기 위해 Ca(OH)₂에 의한 침전물 생산 방법이 우수하여 대량생산에 응용될 수 있다.

제주도에서 구입한 재래 감귤인 산물, 스타치, 청귤, 병귤, 온주, 당유자, 하귤, 한라봉을 대상으로 위와 같은 방법으로 flavonoids를 추출하여 naringin과 hesperidin의 함량을 조사한 결과 수확기에 다른 naringin과 hesperidin의 함량에 큰 차이가 있는 것으로 나타났다.

다. 토끼를 이용한 flavonoids 투여에 따른 고지혈증 및 동맥경화 예방 및 치료 활성 검증 :

체중 2.5~2.6 kg의 3 개월령 뉴질랜드 백색종 (New Zealand White)의 건강한 수컷 토끼를 이용하여 1% 고콜레스테롤 식이와 함께 naringin, hesperidin 및 naringin metabolite를 병행 투여하여 심장순환기 질환의 예방 및 치료 효과를 관찰하고자 하

였다. 혈액화학 분석을 통한 혈중 콜레스테롤 및 지방의 변화, 대동맥내 지방선의 관찰, 간조직내 지방 함유 비정상 세포를 분석한 결과, 총콜레스테롤은 JBB-6가 50%, JBB-10이 46% 감소된 좋은 결과를 얻었고, 지방성 침착은 대조군과 비교하여 전반적으로 유의성 있게 감소된 양상을 나타내어 시험물질 모두 혈관내 콜레스테롤 침착을 효과적(특히 JBB-8, JBB-12)으로 억제하는 것으로 판단되었고, JBB-7, 10, 11, 14의 경우에는 대조군에 비하여 유의하게 낮은 간세포의 손상율을 보여 간보호 효과가 있음을 암시하였다. JBB-8 및 JBB-12를 투여한 군의 liver microsomal ACAT 활성도가 20-25% 정도 감소하였다. 이로부터 naringin, hesperidin을 비롯하여 naringin metabolite들의 동맥경화 및 고지혈증 예방 및 치료 효과를 관찰하였다.

라. 진피추출액의 고혈압쥐에 대한 혈압 및 심박수 측정 :

진피 Ethanol extract의 경우 사용된 3 종의 고혈압 쥐에서 혈압상승에 연이은 혈압강하작용의 이중효과를 보였으며, 비마취 DOCA/salt 고혈압쥐에서 가장 큰 potency 및 두드러진 경향이 관찰되었다. 대조물질인 Hesperidin의 경우도 DOCA/salt 고혈압 쥐에서 현저한 용량의존성의 지속적인 혈압강하작용을 보였으며 RHR에서도 혈압강하작용의 경향을 보였다. 이상의 결과로 보아 진피 Ethanol extract의 경우 이노작용에 의한 혈압강하작용이 기대되고 분별추출 및 단일물질분리에 의한 추가실험과 장기 투여 protocol에 의한 생리활성의 추가규명을 통해 고혈압 및 순환계 질환 치료 작용을 보다 명확하게 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

마. 논문 발표 및 특허출원, 등록

본 연구과제를 수행하면서 국외논문 6 편, 국내 논문 1 편을 발표하였으며, 미국특허 3 건이 등록되었고, 국제특허 10 건, 국내 특허 32 건을 출원하였다.

2. 연구결과 활용 계획 및 건의

감귤피분말, 감귤 flavonoids를 함유하는 식품의약(Nutraceutical) 또는 건강보조식품을 개발하여 산업화하고자 하며, 한편으로 국내 타 식품업체를 통한 신제품 응용 개발이 가능할 것이다.

감귤 부산물 등 농산부산물을 이용하여 고부가가치 제품 생산의 가능성을 제시함과 동시에, 제주도 감귤협동조합 등과 연계하여 무공해 감귤을 생산하고 현지 추출 공장 설립을 통해 원료 조달 및 가공을 자체적으로 수행하고자 한다.

본 연구팀이 출원한 국내 및 해외 특허를 바탕으로, 감귤류의 생산과 소비가 국내

에 비해 월등하게 많은 미주지역의 외국업체에 대한 기술이전을 통한 사업화가 추진 중이다.

동물실험을 통해 감귤피분말, 갈귤피 추출액, 감귤 flavonoids의 고지혈증, 동맥경화증 및 간기능 보호작용이 있음을 확인하였다. 따라서 고지혈증 및 동맥경화증 환자들을 대상으로 한 임상 연구가 이루어져야 할 것이다.

여 백

SUMMARY

I. Subject

Development of New Bioproducts for Prevention and Treatment of Cardiovascular diseases from agricultural resources

II. Purpose and Objectives

Cardiovascular diseases (hypertension, arteriosclerosis, cardiac infraction, paralysis, hyperlipidemia etc.) occupy 30-40% of overall mortality rate. The worldwide market scale of medicines for cardiovascular disease reaches to 50 billion dollars yearly. Many medicines for hypertension and arteriosclerosis have been developed but they are very expensive and must be taken carefully with a doctor's prescription due to the possible side effects and so forth. There has not been any good but medicines for prevention or treatment for liver function, and those have to be taken carefully due to its toxicity. As chronic diseases such as liver disease or cardiovascular disease being processed slowly over a long period, it is necessary to develop non-adverse reaction and non-toxic food substance that can be taken as food for prevention and treatment of the disease. This kind of research is just now at the beginning stage even in advanced countries like USA or Europe.

This work is initiated in the hope of developing new bioproducts from agricultural resources. The specific objective is to develop new useful bioproducts for prevention and treatment of Cardiovascular diseases.

III. Scope of The Study

The research was performed with the scope and area of the study as below.

1. Screening of CETP inhibitors from natural products
2. Content analysis of naringin and hesperidin in citrus peel
3. Large scale extraction of bioflavonoids from tangerine peel
4. *In vivo* efficacy test for naringin, hesperidin, and naringin metabolites in

high cholesterol fed rabbits

5. *In vivo* efficacy test for naringin, hesperidin, and naringin metabolites in high cholesterol fed rats
6. *In vivo* efficacy test for tangerine peel extract and jujube extract using hypertension rats

IV. Results and Applications

1. About 90 plant extracts were determined the inhibiting activity of CETP. It led us to select 15 plants as a useful bioproducts. Two compounds of CETP inhibitors were isolated from ginger. They seemed to have a structure similar to that of [10]-dehydrogingerdione and [6]-dehydrogingerdione, respectively. [10]-dehydrogingerdione and [6]-dehydrogingerdione inhibited human CETP with IC₅₀ values of 35 μ M and 120 μ M, respectively.
2. The contents of naringin and hesperidin, the flavonone glycosides of citrus plants, in citrus peel were determined with HPLC. And the method of large scale extraction of bioflavonoids from tangerine peel was established with ethanol and alkaline solution.
3. Naringin, hesperidin, and naringin metabolites exhibit the cholesterol-lowering action in high cholesterol diet fed rabbits and rats. The mode of action is a enzyme inhibitory activity against hepatic ACAT. The regression effect of fatty streak of aorta is similar to lovastatin that is a well-known HMG-CoA reductase inhibitor. The liver toxicities of naringin, hesperidin, and naringin metabolites treated animal groups were lower than those of control group and lovastatin treated group.
4. Naringin, hesperidin, and naringin metabolites can be utilized for development of the functional foods or health foods. By applying these bioflavonoids to human clinical test, they can be reevaluated for human use.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	
I. Background of the Research	17
II. Purpose and Scope of the Research	26
Chapter 2. Overview of Research Development	
I. Overview of Research Development in the World	29
II. Overview of Research Development in Korea	30
Chapter 3. Contents and Results	
I. Scope and Contents	33
II. Results	43
Chapter 4. Achievement and Contribution of the Research	
I. Achievement of the Research	77
II. Contribution of the Research	83
Chapter 5. Application Plan of the Results	85
Chapter 6. References	87

여 백

목 차

제 1 장 서론	
제 1 절 연구 개발의 필요성	17
1. 연구의 배경	17
2. 연구의 필요성	18
제 2 절 연구개발 목표 및 내용	26
1. 최종 목표	26
2. 연차별 연구개발 목표 및 내용	27
3. 연구개발 추진체계	28
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	
제 1 절 해외 연구 개발 현황	29
제 2 절 국내 연구 개발 현황	30
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절 연구개발수행 내용 및 방법	33
1. 식물체로부터 시료조제	33
2. CETP 저해제 탐색	33
3. 감귤과피로부터 Flavonoids의 함량 분석 및 대량 추출	35
4. 혈액화학 분석	36
5. Liver microsomal ACAT 활성 검색	38
6. 토끼를 이용한 건강개선 약효검정	38
7. 쥐를 이용한 건강개선 약효검정	40
8. 고혈압쥐의 혈압 및 심박수에 미치는 영향 조사	42
제 2 절 연구개발수행 결과	43
1. CETP 저해제 탐색	43
2. 감귤류 과피의 Flavonoids의 함량 분석 및 대량 추출 방법 확립	51
3. 토끼를 이용한 Flavonoids 투여에 따른 고지혈증 및 동맥경화 예방 및 치료 활성	

검정	54
4. 쥐를 이용한 Flavonoids 투여에 따른 고지혈증 예방 효과 검정	66
8. 진피추출액의 고혈압쥐에 대한 혈압 및 심박수 측정	69
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	
제 1 절 연구개발목표의 달성도	77
제 2 절 대외 기여도	83
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	85
제 6 장 참고 문헌	87

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구의 배경

우리나라는 현재 WTO체제에 가입함으로써 2000년대 초까지는 국제경쟁력을 갖춘 첨단농업기술보급을 통해 농업분야의 소득 및 기술을 선진국수준으로 끌어올려야 할 처지에 놓이게 되었다. 이를 위해서는 첨단 신기술개발과 국제 경쟁이 가능한 농산물 생산기술개발이 시급한 바 이미 농수산부, 농진청 등에서는 몇몇 분야의 작물, 과채류, 가축류, 기타 기계화-자동화 및 가공 기술 등의 경쟁력을 검토 분석하였다.

여기에서는 우리가 새로운 각오로 개척하면 세계시장에 크게 진출할 수 있고 농가 소득, 농촌경제에 큰 파급효과를 가져올 수 있을 것으로 생각되는 개발분야를 설명하고자 한다. 현재 전세계에서는 극심한 환경오염문제에 따라 일반 국민들의 관심사 및 선호도가 변하고 있다. 많은 사람들이 천연물을 선호하고 있으며, 건강에 좋은 식품에 큰 관심을 갖고 있다(1). 농산물도 청정농산물, 무농약처리 유기농법에 의해 생산된 것을 찾는 사람이 늘고 있으며 건강에 좋다는 생선의 소비량이 증가하고 있다. 서양 특히 독일에서는 식물체 추출액을 건강유지 내지 질병 억제용으로 사용하고 있으며(2), 미국 등지에서도 동양의 생약원료 수입이 급증하고 있다.

이러한 세계적인 상황변화 추세에 맞추어 우리나라에서 생산되는 농산물, 과채류, 산채류, 약용식물 등을 탐색하여 건강에 유익하거나 질병 억제에 유익한 생체활성물질을 탐색하고, 이를 함유하는 특용작물을 개발 보급하고, 이들 성분 및 작물의 응용 가공 기술을 개발하면 국제 경쟁에서 승산이 있는 새로운 농업분야 산업이 육성될 수 있을 것으로 생각된다.

우리나라는 다음 몇 가지 점에서 이러한 산업이 유망할 것으로 생각된다.

첫째, 우리나라는 오래 전부터 동의보감 등에서 볼 수 있듯이 생약성분함유 약용식물을 이용한 민간요법이 개발되었으며 이들의 연구자료를 이용하여 현대적인 분석기술 및 생명공학기술을 도입할 경우 신규 고성능 활성물질을 우리나라 자생의 농산물 및 식물들로부터 추출이 가능할 것이다. 둘째, 유럽, 미국 등 서양에서는 현재 청정농산물에 관한 관심, 건강에 관한 관심이 급증하고 있으며 천연물, 건강보조기능의 천연농산물, 유기농법 내지 심지어 생약제제에 대한 소비량이 급증하고 있는 실정이다.

셋째, 산업적인 측면에서 이미 유럽의 독일, 프랑스, 스위스 등에서는 식물로부터 유용물질을 추출하여 건강유지용 제제에 크게 이용하고 있으며 가장 큰 성공사례는 독일에서 유명한 은행잎 추출액을 이용한 뇌혈관 혈류 혈행개선제 및 항암제로 크게 부각되는 주목의 잎에서 추출된 택솔(taxol)을 들 수 있다(2).

최근 미국에서는 FDA에서 식물성분 추출액 및 이들 성분의 이용에 관해 공식으로 인정할 움직임이며 건강유지, 질병예방용 기능성 생물소재시장이 크게 확대될 전망이다.

본 연구팀은 오랫동안 심장, 혈액 순환기 관련 질병 예방 치료 활성물질 탐색연구를 개척해 왔다. 심혈관 질환은 전체 사망률의 30%를 차지하며 사망률 18%의 암과 더불어 가장 큰 만성 성인병으로 현재 연간 40조원 이상의 세계시장을 보유하고 있다. 만약 독성이 없는 유용한 물질을 식용성 식물체로부터 추출할 경우 수요량이 크게 늘 것이다. 한편 서양의학에서 사용하는 치료제 개발 전략은 동맥경화증, 뇌경색, 중풍 등 한국에서 크게 문제되는 질병에 별로 효과가 없다. 예방차원에서 건강식품 성분이나, 첨가제 혹은 기능성 식품성분으로 자주 섭취하는 것이 심장 순환기 질환이나 암의 예방에 더욱 효과적일 수 있다. 이 분야의 연구에서 한국은 국제경쟁력을 갖추기 쉬운 것으로 보는데 이는 천연물 연구가 미국, 유럽에서는 활발하지 못한 편이고 연구 인력도 부족한 반면, 한국에는 산채연구, 약용식물, 생약연구 등에 많은 연구 경험이 쌓여 있고 동의보감 등 여러 응용기술이 오랫동안 알려져 있었기 때문이다.

이들 기능성 활성물질들은 개발될 경우 수출산업으로 유망하며 농가소득증대 및 농촌경제 활성화에 크게 기여할 수 있을 것으로 분석된다. 이에 본 연구팀은 국내의 식용 농수산물 및 산채, 약용식물 등 농산 자재로부터 시장 수요가 가장 큰 분야인 심장 및 뇌혈관 관련 질병예방 등에 유용한 활성물질을 탐색연구하고 이들 특용작물의 보급 및 가공제품연구에 기여하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

본래 인류는 질병의 예방, 치료분야에 수천년 전부터 자연계의 식물 및 동물자원 등 농산자원을 유용하게 이용하여 왔으나(1,2) 현대 문명의 발달과 더불어 대부분이 서양의 제약회사에 의해 화학물질이용으로 대체되었다. 그러나 아직도 식물추출액에서 원료생산을 하는 주요 약품의 예를 들어보면 몇몇 스테로이드 및 각종 알칼로이드

계 물질을 들 수 있다(표 1).

암이나 심장순환기질환에는 예방차원의 연구가 중요한 일면이 있으나, 서양의학은 치료제 연구에 집중적인 투자를 해왔다. 심장병의 주요원인으로 고혈압, 고지혈증, 비만증, 흡연, 당뇨 등이 보고되고 있으며 특히 혈중 콜레스테롤의 양이 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려졌다. 혈중 콜레스테롤의 양이 높을 경우 혈관벽에 지방과 더불어 macrophage, smooth muscle cell 및 foam cells 등이 생성, 침착되고 plaque 를 형성하여 혈관을 가로막는 동맥경화증세가 오기 쉬운 것으로 알려져 있다(3). 혈액의 점도가 높으면 혈류운행저해 및 고혈압의 원인이 될 수 있고 platelet의 aggregation이 심화될 수 있어 순환기 질환의 원인이 될 수 있다. 혈중 콜레스테롤은 간에서 생합성되거나 외부로부터 음식에 의해 흡수된다. 혈중 콜레스테롤의 양이 높을 경우 동맥경화 및 기타 심장병의 주요 원인이 되는 것으로 밝혀지고 있다(4,5)

서양의학에서는 심장순환기 질환의 원인이 되는 분자생물학에 기초한 발병작용을 연구하고 이에 관여하는 효소나 수용체 등을 선택적으로 억제하는 과학적인 방법도 도입하여 신약개발을 서두르고 있다. 대표적인 성공사례로는 콜레스테롤의 생합성에 관여하는 효소 중에 중요한 위치에 있는 HMG-CoA reductase 저해제를 들 수 있는데 현재 Mevacor란 상품명으로 개발에 성공된 이 제품은 연간 1조 3000억원의 시장을 점유하고있으며 투여시 혈중 저밀도 지단백질(LDP)을 25%, 콜레스테롤 총량의 15% 정도를 낮출 수 있는 것으로 보고되어 있다(6). 이밖에 콜레스테롤 생합성을 저해할 수 있는 중요 위치에 있는 또다른 효소 즉 squalene synthetase 저해제 탐색도 시도되고 있다. 이러한 전략은 콜레스테롤이 몸속에서 생합성되는 경로를 조절하여 혈중 콜레스테롤의 양을 줄이려는 노력이다. 또한 콜레스테롤이 음식을 통하여 몸속으로 흡수되는데 관련된 것으로 알려진 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 저해제 탐색을 통해 혈중 콜레스테롤의 양을 줄이려는 노력이 활발히 진행되고 있다(5).

한편 최근에는 콜레스테릴 에스터를 혈중의 고밀도 지방단백질(HDL)로부터 저밀도 지방단백질(LDL)로 전이시키는데 작용하는 cholesterol ester transfer protein(CETP)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이 CETP의 작용으로 혈중 LDL의 양이 많아지면 동맥경화 및 다른 심혈관 질환이 증가함이 알려지고 있다(4). 따라서 많은 회사들이 CETP 저해제 탐색에 힘을 기울이고 있다. 다른 한편에는 혈류개선, 혈액의 점도강하 등을 위해 혈액 응고에 관련하는 효소인 thrombin의 작용을 억제하는 연구도 활발하다(7).

지금까지 많은 연구개발 노력이 진행되었지만 심장병에 의해 사망하거나 불구자가 되는 환자수는 전세계적으로 증가하고 있으며 전혀 개선되지 않고 있다. 이를 볼때

근본적으로 서양의학이 지향하는 치료제 개발전략이 심장순환기 질환 모델에는 만족한 해답을 주지 못함이 확실하다. 특히 동맥경화증, 중풍 등 한국에 흔한 질병은 오랫동안 병증세가 서서히 진행되어가는 특징이 있는 것이므로 치료제보다는 병 증상의 진전을 억제하는 예방차원의 활성물질 및 제제개발이 요구되고 있다. 이런 일을 하는데는 식품을 통한, 농수산물 등에 존재하는 자연계의 천연물질, 무독성 활성물질의 개발 이용이 적합할 것으로 생각된다. 합성의약품에 의한 치료방법은 마지막 수단으로서, 치료를 요할 만큼 병증상이 나타났을 때는 치료하기에 이미 너무 늦은 상태일 수 있다.

동양에서는 식품의 섭취를 통해 병증세를 완화하거나 예방하고자하는 연구가 활발히 진행되었으며(8), 특히 우리나라는 동의보감 등 민간요법의 전통이 확립되어있어 수많은 농산물, 산채, 한약재 등이 연구되어왔다(9, 10, 11, 12). 여기에 인용된 콜레스테롤 저하 및 고혈압, 혈류개선에 유효한 대표적인 농산물, 산채, 약용작물들을 살펴보면 다음과 같다 : 양파, 마늘, 셀러리, 쑥갓, 쑥, 우엉, 푸른감, 포고버섯, 곤약, 톳나물, 콩, 개다래, 겨울딸기, 방풍, 살구, 무화과나무잎, 소나무잎, 울무, 칩, 산쑥, 명아주, 왜나무, 등글레, 구기자, 비자열매, 옥수수털, 뽕나무잎, 질경이잎·씨, 홍화꽃, 느티나무꽃, 두릅나무껍질·가시, 벽오동껍질, 왕대, 종려잎·열매, 참나무 등.

서양에서 특히 독일에서는 식물유래생약(phytomedicine)에 많은 과학적인 연구를 시도하였으며 은행잎과 마늘 추출액을 이용한 뇌혈관 혈류개선제 등이 산업화에 크게 성공하였다(2). 최근 미국에서도 만성 성인병 질환의 예방차원에서 음식을 통한 질병예방의 연구가 영양학 및 예방의학, 약학차원에서 활발히 진행되고 있다(1). 심혈관 질환 관련해서 크게 유용한 것으로 알려진 성분을 함유하는 농산물 등은 아래와 같다(표 2).

이상에서 살펴본 바와 같이 서양의학의 발달도 심장병 문제 해결에 미진한 상태에 있으며, 동양의 생약연구, 유럽·미국의 식물유래 추출액 연구 등 사례에서 보면 오히려 예방의학차원에서 이들 농수산물 재료로부터 추출된 활성 성분이 유용하게 쓰일 것으로 전망된다. 농산자원으로부터 유용물질을 개발하기 위해서는 첨단분석기술, 물질분리정제기술, 최신의 선택적인 약효활성 검색법 등을 적용할 필요가 있다. 현재 서구에서 많이 쓰이고 있는 과학적인 방법을 도입하고, 농수산물 등 천연자원을 소재로하여 혈액속의 콜레스테롤 강하제, 혈압강하제, 혈류개선제, 항응혈제, 항혈전제 등의 개발에 성공한다면 관련 특용작물개발 및 관련제품산업 육성이 가능할 것이다.

Table 1. Some Examples of Economically Important Plant-Derived Drugs and Intermediates that are Still Obtained Commercially from Whole-Plant Sources (2)

Compound or Class	Botanical Sources	Therapeutic Category/Use
A. Steroids		
1. Hormones (derived from diosgenin, hecogenin, and stigmasterol)	Dioscorea spp. (Mexican yams); soybean-derived stigmasterol	Oral contraceptives and other steroid drugs and hormones
2. Digitalis glycosides (digoxin, digitoxin)	Digitalis purpurea L., D. lanata Ehrhart (foxgloves)	Cardiotonic glycosides (cardenolides)
B. Alkaloids		
1. Belladonna-type solanaceous tropane alkaloids (atropine, -hyoscyamine, scopolamine)	Atropa belladonna L. (belladonna), Datura metel L., D. stramonium L. (jimson weed), Hyoscyamus niger L. (henbane), Mandragora officinarum L. (European mandrake) and other solanaceous species	Anticholinergics (parasympatholytics)
2. Opium alkaloids (codeine, morphine)	Papaver somniferum L. (opium poppy)	Analgesics, antitussive
3. Reserpine	Rauvolfia serpentina (L.) Bentham ex Kurz (East Indian snakeroot)	Antihypertensive, psychotropic
4. Catharanthus (Vinca) alkaloids (vinblastine, vincristine)	Catharanthus roseus (L.) G. Don (Madagascan rosy periwinkle)	Anticancer
5. Physostigmine	Physostigma venenosum Balfour (Calabar bean)	Cholinergic (parasympathomimetic)
6. Pilocarpine	Pilocarpus jaborandi Holmes (jaborandi) and related species	Cholinergic (parasympathomimetic)
7. Cinchona alkaloids (quinine, quinidine)	Cinchona spp. (Cinchona bark)	Antimalarial, cardiac antiarrhythmic
8. Colchicine	Colchicum autumnale L. (autumn crocus)	Antigout
9. Cocaine	Erythroxylum coca Lamarck (coca leaves)	Local anesthetic
10. α -Tubocurarine	Strychnos toxifera Bentham, Chondodendron tomentosum Ruiz et Pavon (curare)	Skeletal muscle relaxant
11. Taxol	Taxus brevifolia Nutt. (western or Pacific yew)	Anticancer

표 2. 순환기 질환에 예방 약효를 보이는 농산물 등 (1)

농 산 물	작 용
마 늘	혈압강하, 혈액응고작용 억제(항응혈제)
부 추	항응혈제
양 파	혈압강하, 항혈전작용, 혈소판응집억제, HDL 증가
밀, 보리, 귀리, 호밀, 콩	콜레스테롤 합성저해
녹 차	혈압강하, 모세혈관강화
가 지	콜레스테롤 흡수저해
고구마	콜레스테롤 흡수저해
오렌지껍질	콜레스테롤 흡수저해
버 섯	콜레스테롤 강하, 혈액점도 강하
생 강	혈액점도 강하, 콜레스테롤 강하
올리브유	HDL 증가
갈색해초	혈압 강하

나. 경제, 산업적 측면

현재 전세계 의약품시장은 약 300조원에 달하고 있으며 심장순환기계 의약품은 약 40조원에 달하고 있고 연간 10%이상 성장하고 있다. 특히 혈중 콜레스테롤을 낮추려는 의약품 분야는 연간 20% 이상의 고성장을 기록하고 있다. 따라서 경제적으로 보았을때 심장순환기 관련 질환 예방, 치료제 분야는 엄청나게 커다란 산업을 형성하고 있으며 표 3에서 보면 알수 있듯이 세계에서 가장 많이 판매되는 의약품 20개중 6개가 심장순환기 계열 치료제이며 표 4에서 보면 현재 연구개발되고 있는 top 25 의약품 중에서도 3위에 심장병약, 13위에 thrombin 저해제, 16위에 동맥경화-고지혈 치료제, 17위에 고혈압 치료제 등 수 많은 연구개발활동이 심장순환기 질환 치료제 분야에 집중되어 있음을 알 수 있다.

전체 심장순환기 질환중 현재는 고혈압 치료제가 주종을 이루고 있으나, 가장 성장이 빠른 분야는 고지혈증, 콜레스테롤 저하제 및 thrombin 저해제로 볼 수 있다(표 5, 표 6, 표 7).

표 3. Top 20 의약품 (Scrip, 1994)

순위	약 품	약 효 군	회 사	매출액 (\$million)
1	Zantac(Ranitidine)	anti-ulcer	Glaxo	3,520
2	Procardia/Adalat (nifedipine)	cardiovascular	Pfizer/Bayer	2,100
3	Vasotec(enalapril)	cardiovascular	Merck & Co	2,065
4	Epogen/Procrit (erythropoietin)	anaemia	Amgen/J&J/others	1,806
5	Capoten(captopril)	cardiovascular	BMS/Sankyo	1,800
6	Pravacho/Lipostat (pravastatin)	lipid lowering	BMS/Sankyo	1,651
7	Losec/PriLOSEC (omeprazole)	anti-ulcer	Astra/Merck	1,642
8	Humulin/Novolin (Human+Animal insulin)	antidiabetic	Lilly/Novo Nordisk/others	1,610
9	Cardizem/herbesser (diltiazem)	cardiovascular	MMD/Tanabe/others	1,544
10	Intron A/Sumiferon/ roferon-A (alpha-interferon)	anticancer	S-Plough/ Sumitome/ Roche/others	1,466
11	Mevacor(lovastatin)	hypolipaemic	Merck	1,310
12	Pepcid/Gaser(famotidine)	anti-ulcer	Merck/Yamanouchi	1,260
13	Tagamet(cimetidine)	anti-ulcer	SB	1,208
14	Cipro(ciprofloxacin)	antibiotic	Bayer	1,200
15	Novolin(human insulin)	antidiabetic	Novo Nordisk/ Lilly	1,170
16	Zovirax(acyclovir)	antiviral	Wellcome	1,163
17	Prozac(flouxetine)	antidepressant	Lilly	1,150
18	Voltaren?Emulgel (diclofenac)	NSAI	Ciba	1,140
19	Ventolin/Proventil (salbutamol)	bronchodilator	Glaxo/S-Plough	1,137
20	Augmentin (amoxicillin + clavulanic acid)	antibiotic	SB	1,120

Æ 4. The 25 leading therapeutic categories in February 1995 in terms of drugs in development

Ranking in February 1995	Therapeutic Category	Number of Compounds
1	Anticancer(K6Z)	389
2	Anti-inflammatory(M1A1)	289
3	Cardiovascular(C9Z)	264
4	Anti-asthma(R8A)	255
5	Antiviral, anti-HIV(J5A)	251
6	Anticancer, immunological(K3)	244
7	Neuroprotective(N7C)	219
8	Recombinants, other(T2Z)	207
9	Vaccine(J7A)	194
10	Memory enhancer(N6D)	192
11	Immunosuppressant(I5)	183
12	Antiviral, other(J5Z)	172
13	Anti-thrombotic(B1B9)	163
14	Non-recombinants, antibodies(T1B)	158
15	Alimentary/metabolic(A16)	152
16	Hypolipaeic/anti-atherosclerotic(B4A)	150
17	Antihypertensive, other(C2B9)	145
18	Anti-arthritis, other(M2Z)	142
19	Analgesic, other(N2Z)	133
20	Anti-anginal(C1D3)	128
21	Monoclonal antibody(I4A1)	121
22	Ophthalmological(S12)	121
23	Antipsoriasis(D5A)	120
24	Osteoporosis(M5A)	117
25	Gene therapy(T4)	115

Source : Table adapted from Pharmaprojects(1995).

Æ 5. The top selling cardiovascular drugs in 1993

Rank	Brand name	Indication	Company	Sales (US\$ million)
2	Procardia/Adalat	Angina/Hypertension	Pfizer/Bayer	2100
3	Vasotec	Hypertension	Merck	2065
5	Capoten	Hypertension/CHF	BMS/Sankyo	1800
9	Cardizem	Angina/Hypertension	MMD/Tanabe/others	1544
11	Mevacor	Hypolipaeic	Merck	1310

Note : CHF=Congestive heart failure; BMS=Bristol-myers Squibb; MMD=Marion Merrell Dow.

⌘ 6. Estimated sales revenues from the various classes of drugs used in the management of patients with stroke in 1987 and 1993

Drug type	Estimated revenues in millions of US\$ (% of total cardiovascular market)	
	1987	1993
Antiplatelet	1054 (5.7)	1892 (5.2)
Anticoagulant	380 (2.0)	594 (1.6)
Thrombolytic	297 (1.6)	1670 (4.6)
Cholesterol-lowering agent	632 (3.4)	3524 (9.6)

Note : Sales estimates are expressed as percent of the total cardiovascular market.

⌘ 7. The top selling drugs in the two most rapidly growing categories of 'other' cardiovascular drugs - thrombolytics and cholesterol-lowering agents - used in the management of patients with stroke

Drug name	Brand name	Company	Therapeutic class	Estimated revenue 1993 (US million)
Lovastatin	Mevacor	Merck	Lipid lowering	1000
Pravastatin	Mevatolin/ Pravachol	Sankyo/BMS	Lipid lowering	850
Simvastatin	Zocor	Merck	Lipid lowering	600
APSAC	Eminase	SKB	Thrombolytic	500
TPA	Activase	Genentech/ Boehringer B Ingelheim/ Kyowa Hakko Mitsubishi	Thrombolytic	500
Streptokinase	Various	Various	Thrombolytic	350
Cholestyramine	Questran	BMS	Lipid lowering	200
Fenofibrate	Lipidil	BMS	Lipid lowering	200
Gemfibrozil	Lopid	Warner-Lambert	Lipid lowering	200
TPA		Wellcome/Yoshitomi	Thrombolytic	110
Probucol	Loreico	MMD	Lipid lowering	100

이상에서 살펴본 바와 같이 현재 혈중 콜레스테롤 저하제 및 고지혈증 치료제 연구가 가장 활발하여 Mevacor 등 여러 종류의 신제품들이 앞으로 큰 시장을 점유할 것이며 이 분야의 제품개발에 주력하면 세계시장 진출이 가능하고 농가소득이 크게 올라갈 수 있을 것이다.

다. 사회, 문화적 측면

심장마비, 동맥경화증, 뇌졸중 등 순환기 질환은 만성 성인병으로서 현대 과학이 발달하고 수많은 치료제가 계속 나오고, 심장병 치료 약품시장이 매년 10% 이상 성장하고 있음에도 불구하고 전혀 개선의 여지가 보이지 않고 환자수가 계속 증가하고 있다. 45세 이상 고령층에 많은 이 질병은 주요발병원인으로 고혈압, 흡연, 비만증, 고지혈증, 당뇨 등이 지적되고 있으며, 미국에서만도 연간 90 만명이 타격을 받고 있으며 15 만명이 사망하는 것으로 알려져 있다(6). 전세계적으로 심장순환기 질환은 전체 사망률의 30%를 웃돌고 있으며, 한국도 예외가 아니다. 한국에서는 특히 동맥경화, 뇌졸중, 중풍 등이 심각한 사회문제로 대두되고 있다.

한편, 서양에서는 문명의 발달에 따른 운동부족, 과도한 지방질 섭취 등으로 심장병이 심각한 문제로 대두되었으며, 최근 일반국민들은 사고방식이 바뀌어 화학물질보다 천연물, 천연물 음식, 천연 건강증진물질, 건강식품, 생선섭취, 무공해 농산물 섭취 등 건강관련 사안에 관심이 많아지고 있다. 특히 음식성분의 생화학적, 약리학적 연구를 통해 질병을 예방하고자 하는 연구가 활발하다(1).

현재 미국에는 300 여개의 중소기업들이 중국에서 생약재를 수입하여 건강보조제로 가공하고 있으며 내출도 연간 10-20% 성장하고 있고, 총매출이 약 1조 3,000억원에 이르고 있어 일반사회의 사고방식이 급히 변화하고 있음을 알 수 있다. 우리나라는 오랜 관습과 전통으로부터 산채, 생약제제, 건강 식물 등의 개발에 많은 아이디어가 나올 수 있다. 이들 연구를 통해 세계에서 사회문제가 되는 만성 심장순환기 질환의 예방에 크게 기여하고 한국에 흔한 중풍 등 뇌혈관 질환을 예방할 필요가 있다.

제 2 절 연구개발 목표 및 내용

1. 최종 목표

심혈관 질환 예방·치료에 활성을 보이는 생체활성물질을 함유하는 농작물, 특용작

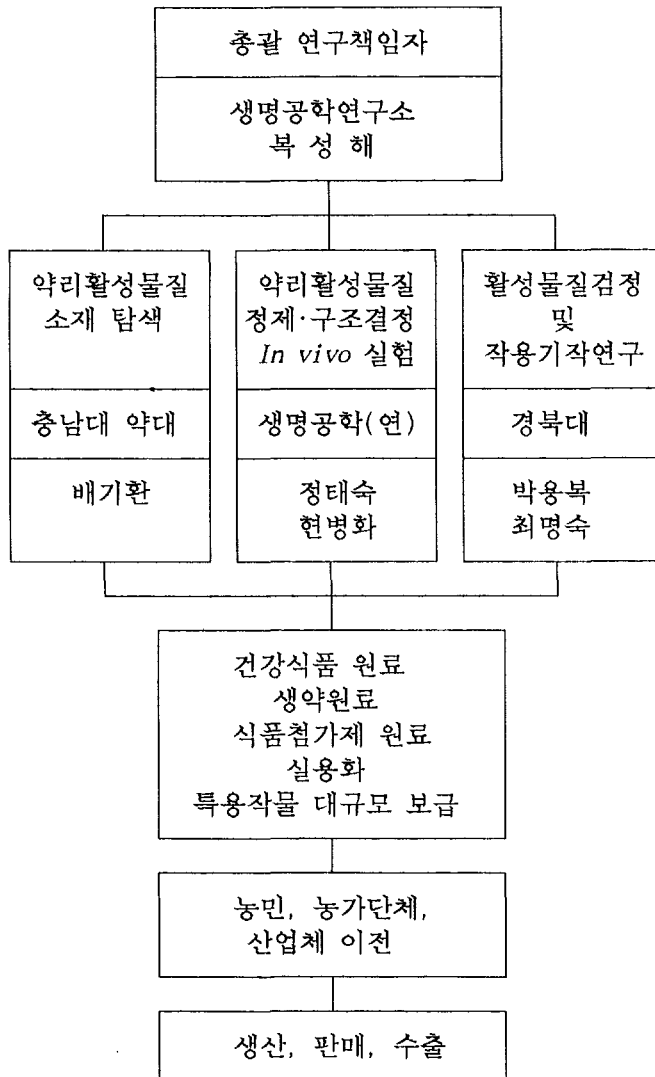
물, 약용작물, 산채, 과채류 등을 탐색하고 이들의 대량생산 보급기술을 추진하며 이들로부터 유용물질 성분들을 분리·정제하며 기능성 건강증진용 성분, 건강식품성분, 약용성분원료로 개발하여 농가소득증대, 농촌경제 활성화, 생약재 수입 대체 및 수출 산업 창출에 기여한다.

2. 연차별 연구개발목표 및 내용

(단위:천원)

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발내용 및 범위	추정연구비
1차년도 (1995-1996)	생체활성 신기능 물질 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - 약리활성물질, 기능성물질 함유 특용작물, 농수산 자재 및 산채 탐색 - 약리활성물질 검색법 확립 - <i>In vivo</i> 활성검색법 확립 - 물질의 분리정제 및 구조결정 시도 	100,000
2차년도 (1996-1997)	생체활성물질의 분리, 정제 및 구조결정	<ul style="list-style-type: none"> - 각종 심혈관질환의 예방, 치료 활성물질 분리정제 및 구조결정 - 대량 스크리닝 system 가동 - <i>In vivo</i> 활성 검색 - 활성성분의 응용 연구 시작 	100,000
3차년도 (1997-1998)	기능성 물질의 생산기술 및 <i>in vivo</i> 실험	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성 물질의 대량생산, 분리, 정제 및 구조결정 - 기능성 물질을 이용한 시제품 제조 - 기능성 물질의 세계 특허출원 	120,000
4차년도 (1998-1999)	기능성 물질의 대량생산 체계 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 대량생산, 분리정제기술 - 기능성 물질 함유 특용작물 개발 보급연구 - 대량생산 system 연구 - 동물, 독성실험 완결 - Pilot plant 가동 - 제품 등록 - 산업체 기술 이전 	120,000

3. 연구개발 추진체계



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 연구 개발 현황

외국의 경우 콜레스테롤 합성에 관여하는 효소인 HMG-CoA reductase 저해제 개발에 성공하여 Lovastatin(Merck Co), Pravastatin(Sankyo Co) 등이 각기 1조원 이상의 매출을 보이고 있으며(13, 6) 아직도 많은 연구소들이 이 분야 연구에 노력하고 있다. 또다른 중요한 콜레스테롤 합성에 관여하는 효소인 squalene synthetase(SQ)저해제를 탐색하는 연구는 최근에 시작되어 Merck사에 의한 Zaragozic acid(14) 및 Glaxo사의 squalestatin(15) 정도가 보고되어 있다. 이 밖에 콜레스테롤 흡수저해제로 Acyl CoA:cholesterol acyltransferase(ACAT) 저해제 연구가 활발하며 이 분야에는 일본에서 주로 개발된 purpactin(16), epicohliquinone A(17), acaterin(18), helminthosporols(19), lacteritin(20), gypsetin(21), enniatins(22), glisprenins(23), pyripyropenes(24), terpendoles(25) 등이 보고되어 있으며 pyripyropenes가 비교적 강한 in vitro 활성을 보이고 있다. 또다른 한 연구분야는 콜레스테롤 전이단백질(CETP)에 관한 분야인데(4) 미국 Upjohn Co., Merck Co.를 비롯한 많은 제약사에서 연구중이며 아직 몇몇 사례만 보고되어 있어 초기 연구단계에 있다. 이 분야는 콜레스테롤이 고밀도 지단백질로부터 저밀도 지단백질로 전이되는 것을 저해함으로써 부작용 없이 고지혈증을 억제하여 동맥경화증세를 예방하고자 하는 시도이다. 또 다른 연구분야는 혈액응고를 억제하여 혈류 운동을 돕고자 하는 연구로써 thrombin 저해제 연구가 대표적인 것이다(7, 26, 27, 28).

식물생약으로부터 약효실험을 거쳐 시판되고 있는 것은 많지 않으며, 대표적으로 독일에서 개발한 은행잎(말초혈관 장애 개선제)과 서양산사자나무잎의 추출물이 제제화되어 시판되고 있고, 중국에서는 해풍으로부터 항류마티스 및 알러지, 혈액개선 치료제로 Kadsurenone이 있다.

국외 의약품 개발분야에서 심장마비, 고혈압 치료제로 angiotensin converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers, β -blockers, HMG-CoA reductase inhibitors와 혈류개선제로 thrombin inhibitors 등이 많은 연구대상이 되었다. 특히 HMG-CoA reductase inhibitors(Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin)는 고콜레스테롤 치료의 1차 선택 약으로, 현재 \$6.5 billion 정도의 시장을 확보하고 있으며, 년 평균 20-30%의 고성장을 지속하고 있다. 그러나 statin류의 물질은 고가의약품

이고, 장기복용시 serum creatine kinase의 농도의 증가, 비염, 두통, 인두염, 독감 증강, 부비동염, 관절통, 불면증 등의 부작용이 보고되어 있어, 새로운 표적을 대상으로 부작용이 적고, 저가의 새로운 고콜레스테롤 및 동맥경화 치료제의 개발이 시급하다.

현재 외국의 경우에는 형질전환동물을 비롯하여 유전자 적중동물을 널리 사용하고 있다. 심장순환기계 연구에 gene knockout 기술을 이용하여 생산된 ApoE 결핍 및 LDL 수용체 결핍 마우스를 널리 사용하고 있다. Apo E 결핍 및 LDL수용체 결핍 마우스는 인체의 병변과 유사하며, 대동맥의 기저부, 흉부대동맥의 소만부, 관상동맥, 경동맥, 쇄골하동맥등에서 죽상경화반의 형성이 관찰된다. 따라서 이러한 모델동물을 이용하여 보다 부작용이 적고 질환 특이적인 신의약의 개발에 박차를 가하고 있고, 새로운 병태생리 기전을 연구하여 기존의 제품과 차별된 신의약을 개발하고자 혼신의 힘을 다하고 있다.

제 2 절 국내 연구 개발 현황

식물자원을 이용한 연구가 일부 관심있는 연구자들에 의해 수행되어 왔으나, 기계적인, 화학적인 분리, 정제 방법에 의해 분리와 함께 식물 추출액을 이용한 복합성분의 결과적 약효만을 제시했을 뿐 target oriented system에 근거한 작용기작 차원에서 접근이 부족한 상태이다.

국내의 경우 대표적인 것으로 독일에서 개발한 은행잎이 말초혈관 장애 개선제로 제제화되어 시판되고 있으며, 서양상사나무(*Crataegus oxycantha* L. em Jacq.)의 잎 추출물이 역시 제제화되어 시판되고 있다. 서울대 천연물연구소의 한용남 교수는 측백나무(*Biota orientalis* L.) 잎에서 BO-V-3라는 물질을 분리하여 PAF receptorfp 대한 실험 결과 은행잎의 약효성분군인 ginkgolide에 필적하는 약효를 나타낸다고 보고한 바 있다.

본 연구팀은 과거 10 여년간에 걸쳐 심장순환기 질환과 관련하여 ACAT, CETP, SQ 등 효소저해제 탐색방법을 개발하였다. 특히 CETP 저해제 탐색방법으로 섬광근점분석법을 사용하여 기존의 다른 방법에 비해 많은 시료를 한꺼번에 처리할 수 있게 되었다. 그밖에 ACAT, HMG-CoA reductase, Thrombin 저해제 탐색방법을 개발, 개선해오고 있다. 인삼등 식물체로부터 10 여종의 CETP 저해제 탐색에 성공하였고, 다수의 ACAT 저해제를 선발하였다. 이들로부터 다수의 특허가 출원 및 등록되었고, 10 여편의 국내외 논문을 발표하였다.

관련 연구 특허 List

1. Song H. Bok, Tae S. Jeong, Sung U. Kim, Byung M. Kwon, Young K. Kim, Kwang H. Son, Hang W. lee, and Yong K. Kwon : Novel Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase Inhibitors and Processes for the Preparation Thereof, U.S. Patent 5,597,835. (1997. 1. 28)
2. 신규 아실-코에이:콜레스테롤 아실전이효소(ACAT) 활성 저해물질 및 이의 제조방법(GERI-BP002 화합물들); 한국 특허 125129 (1997. 10. 2)
3. 신규 아실-코에이:콜레스테롤 아실전이효소(ACAT) 활성 저해물질 및 이의 제조방법(GERI-BP002 화합물들); 한국 특허 176414 (1998. 11. 13)
4. 수베리테논 B(Suberitenone B)와 그 추출방법(CETP Inhibitor); 한국 특허 164153 (1998. 9. 10)
5. 한국 인삼으로부터 추출한 KRIBB-BP006 및 -1의 콜레스테릴 에스터 전이 단백질 (Cholesteryl ester transfer protein, CETP)의 저해제로서의 용도; 한국 특허 159644 (1998. 8. 12)
6. 콜레스테릴 에스터르 전이 단백질 저해제 및 이의 제조 방법(F1064); 한국특허 154504 (1998. 7. 9)

국내·외 논문 발표 List

1. Jeong, Tae-Sook, Sung-Uk Kim, Hang-Woo Lee, Kwang-Hee Son, Yong-Kook Kwon, Myug-Un Choi and Song Hae Bok : Screening of microorganisms having ACAT inhibitor activity from Soil and Characterization of A1-3, ACAT inhibitor produced by *Streptomyces* Sp. A-3, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21: 600-608 (1993).
2. Jeong, T. S., Kim, S. U., Kwon, B. M., Son, K. H., Kim, Y. K., Choi M. U., and Bok, S. H.: GERI-BP001, A New Inhibitor of Acyl-CoA : Cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus* F37, Tetrahedron Letters, 35: 3569-3570 (1994).
3. Jeong, T. S., Kim, S. U., Son, K. H., Kwon, B. M., Kim, Y. K., Choi, M. U., and Bok, S. H.: GERI-BP001 Compounds, New Inhibitors of Acyl-CoA:Cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus* F37 I. Production,

Isolation, and Physico-chemical and Biological Properties, *J. Antibiotics*, **48**: 751-756 (1995).

4. Kwon, B. M., Nam, J. Y., Lee, S. H., Jeong, T. S., Kim, S. U., Son, K. H., Kim, Y. K., Han, K. H., Kim, S. K., and Bok, S. H.: KRIBB-BP005m: a new inhibitor of cholesterol ester transfer protein(CETP) produced from *Trichothecium roseum* F1064. *Tetrahedron Letters* **36**: 6487-6490 (1995).
5. Shin, J., Seo, Y., Rho, J. R., Baek, E., Kwon, B. N., Jeong, T. S., and Bok, S. H.: Suberitenones A and B: novel inhibitors of cholesterol ester transfer protein from the Antacttic sponge *Suberites* sp. *J. Org. Chem.* **60** : 7582-7588 (1995).
6. Kwon, B. M., Cho, Y. K., Nam, J. Y., Lee, S. H., Jeong, T. S., Kim, Y. K., and Bok, S. H: Isolation of cholesterol ester transfer protein inhibitors from *Panax ginseng*. *Chem. Pharm. Bull.* **44**: 444-445 (1996).
6. Kim, Y. K., Lee, H. W., Son, K. H., Kwon, B. M., Jeong, T. S., Lee, D. H., Shin, J. H., Seo, Y. W., Kim, S. U., Kim, S. U., and Bok, S. H.: GERI-BP002-A, novel inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus* F93. *J. Antibiotics*, **49**(1) : 31-36 (1996).
7. Kim, Y. K., Son, K. H., Nam, J. Y., Kim, S. U., Jeong, T. S., Lee, W. S., Bok, S. H., Kwon, B. M., Park, Y. J., and Shin, J. M.: Inhibition of Cholesteryl Ester Transfer Protein by Rosenonolactone Derivatives. *J. Antibiotics* **49**(8) : 815-815 (1996).
8. Son, K. H., Kim, Y. K., Lee, H. W., Lee, W. S., Kim, S. U., Jeong, T. S., Kwon, B. M., and Bok, S. H. : Amplification of farnesyl protein transferase inhibitory activity from *Aspergillus* F37 by Plackett-Burman Design. *Biothchnology Lerrers* **18** : 1297-1300 (1996).
9. Jeong, T. S., Ahn, J. A., Kim, Y. K., Bok, S. H., Kwon, B. M., Shin, J., and Seo, Y. : CETP Inhibitory Activity of Ceramides, Isolated from the Gorgonian *Acabaria undulata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **7** : 1481-1482 (1997).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행 내용 및 방법

1. 식물체로부터 시료조제

농산물재료 및 식품재료를 수집하여 CETP 저해활성을 스크리닝하기 위하여 다음과 같은 전처리를 하였다. 식물체 100 g을 녹즙기를 이용하여 분쇄한 후, 50 ml H₂O와 50 ml Acetone을 첨가하여 24 시간 동안 방치하면서 용매추출을 한다. Whatman paper No.2 나 cotton wool을 이용하여 여과한 후, 감압하에서 농축하고 EtOAc (40 ml x 2)를 이용하여 분획한다. H₂O층과 2번 분획한 EtOAc층을 모아서 감압 농축하고, 시료의 일부를 test-tube에서 완전히 말린 후 시료의 농도가 1 mg/ml가 되도록 조제한 후 CETP 활성검색에 이용했다.

2. CETP 저해제 탐색

가. CETP 단백질원의 부분정제

콜레스테릴 에스테르 전이단백질(CETP)은 적십자 혈액원으로부터 구입한 신선한 human plasma로부터 부분정제하였다 (29-31). 원심분리기를 이용하여 human plasma로부터 분리한 상등액에 BaCl₂를 첨가한 후 2차 원심분리를 하여 lipoprotein을 제거한 lipoprotein deficient plasma를 만든 다음, phenyl-sepharose CL-4B affinity chromatography와 CM-cellulose ion exchange column chromatography를 이용하여 부분정제한 후 소량으로 분액하여 -80°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

나. CETP 활성의 측정

콜레스테릴 에스테르 전이단백질(CETP)의 활성 측정은 [³H]-CETP 섬광근접 분석방법(scintillation proximity assay, 32)을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. [³H]-cholesteryl ester가 HDL로부터 Biotin과 결합된 LDL로 운반되고, 이 Biotin-LDL은 Avidin과 결합된 scintillation molecule (fluomicrosphere)와 결합함으로써 수용액상에서 ³H의 β-emitter가 scintillant molecule과 아주 가까운 거리에 인접함으로써 energy(빛)을 내게되며, 이 빛의 강도를 측정함으로써 CETP의 활성을 검색하게 된다.

CETP 활성 측정 전에 모든 시약을 얼음물로 냉각하였다. 1 ml 짜리 원심분리튜브

에 10 μ l의 분석완충액 (50 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 0.1%(w/v) NaN₃, pH 7.4), 10 μ l의 [³H] cholesteryl ester HDL, 10 μ l의 biotin LDL을 혼합한 후 10 μ l의 CETP (사람의 혈장으로부터 분리된 것, 1.3~1.5 μ g)을 첨가하여 반응을 시작하였다. 이때 공시료는 10 μ l의 CETP 대신에 10 μ l의 물을 첨가하였으며, 대조구로는 10 μ l의 시료 대신에 물이나 메탄올을 첨가하여 같은 조건에서 반응시켰다. 37 °C에서 4 시간 동안 반응시킨 후, 200 μ l의 SPA beads를 첨가하여 반응을 정지시키고, 평형에 도달하도록 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. CETP 활성 측정은 반응시킨 원심분리튜브를 액체섬광계수기 (Liquid scintillation counter)를 이용하여 HDL로부터 LDL로 전이된 cholesteryl ester의 양을 CPM (count per minute)의 단위로 결정하였다.

다. CETP 활성저해제의 탐색

검색하고자하는 식물체는 acetone 추출 후 EtOAc 분획층과 물층을 1 mg/mL가 되도록 조제한 후 CETP 활성검색에 이용하였으며, 대조구로는 시료대신에 MeOH을 사용했고, 공시료(blank)는 10 μ l CETP 대신에 10 μ l H₂O를 첨가하였다. 활성측정 후 50% 이상 억제활성을 나타내는 것을 선별하였으며, 활성저해도는 다음 식으로부터 구하였다.

$$\text{활성저해도(\%)} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{CPM(시료)} - \text{CPM(공시료)}}{\text{CPM(대조구)} - \text{CPM(공시료)}} \right]$$

라. CETP 활성저해물질의 분리 및 정제

식물체에 들어있는 CETP 활성저해물질들은 acetone extraction, EtOAc/H₂O partition, silica-gel column chromatography, preparative thin-layer chromatography, reverse-phase HPLC 등을 이용하여 분리·정제하였다.

마. CETP 활성저해물질의 구조분석

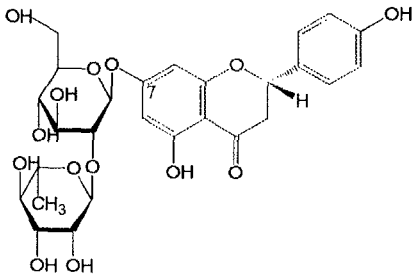
UV 흡광도 분석은 shimadzu UV-265 spectrophotometer로 측정하였으며, IR 흡광도는 Bio-Rad Digilab Division FTS-80 spectrophotometer로 측정하였고, VG70-SEQ mass spectrometry를 이용하여 High resolution MS를 측정하여 분자량 및 분자식을 결정하였다. 또한 핵자기공명기(Bruker 300 MHz, 500 MHz NMR)를 이용하여 ¹H, ¹³C,

HOMOCOSY, HETEROCOSY, HMBC spectrum을 얻었으며, 이들 spectra를 종합적으로 분석하여 구조를 결정하였다.

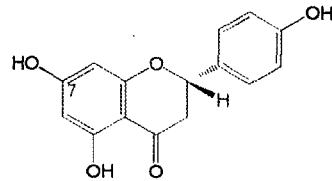
3. 감귤과피로부터 Flavonoides의 함량 분석 및 대량추출

가. 감귤껍질에 함유되어 있는 Naringin과 Hesperidin의 함량조사

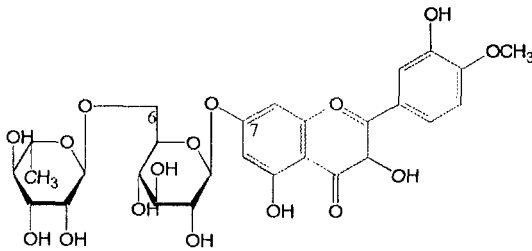
제주도산 감귤껍질을 그늘에서 건조하여 분말화한 시료를 ethanol, NaOH 용액, Ca(OH)₂ 용액으로 추출하고, HPLC를 이용하여 함유하고 있는 Naringin과 Hesperidin의 함량을 조사하였다. 이때 Sigma Co.에서 구입한 순도 98% 이상의 Naringin과 Hesperidin을 표준물질로 사용하였다.



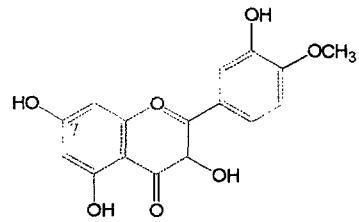
Naringin



Naringenin



Hesperidin



Hesperetin

나. 감귤과피로부터 Flavonoides의 대량추출

Ethanol을 이용한 추출법

감귤건조 과피에 30%, 50%, 70%, 90% 에탄올 용액(건조과피 중량의 10 배액)을 첨가하고 온도 50-60℃로 조절하면서 6-10 시간 동안 교반하면서 추출한다. 추출한 후 5℃ 저온실에서 냉각한 후, 150 μm 여과포를 사용하여 압착, 분리한다. 여과액은 진

공중발농축기에서 40 °C, 760 mmHg의 조건하에서 농축하여 겔상의 엑기스를 얻는다. 5 °C 저온실에서 냉각하면서 온도에 따른 용해도의 변화를 이용하는 재결정법에 의해 순도가 높은 시료를 얻는다.

NaOH 용액 추출법

감귤건조 과피를 0.3%, 0.5%, 1% NaOH 용액 (건조과피 중량의 10 배액) 속에서 온도 50-60°C로 조절하면서 6-10 시간 동안 교반한 후 5 °C 저온실에서 냉각한다. 냉각된 추출액을 150 μm 여과포를 사용하여 압착, 분리하고 여과액을 모아 1 N 염산용액으로 pH 6.8-7.0이 되도록 중화시킨 후 1일 동안 방치한다. 원심분리기를 이용하여 회수된 침전물을 동결 건조하여 시료로 사용한다.

Ca(OH)₂ 용액 추출법

Food mixer로 분쇄한 감귤건조 과피분말에 0.35%, 0.7%, 1% 수산화 칼슘 수용액(건조과피 중량의 10 배액)을 첨가하고 온도 50-60°C로 조절하면서 6-10 시간 동안 교반하면서 추출한다. 추출한 후 5 °C 저온실에서 냉각한 후, 150 μm 여과포를 사용하여 압착, 분리하고 여과액을 모아 1 N 염산용액으로 pH 6.0이 되도록 중화시킨 후 5°C 저온실에서 1일 동안 방치한다. 원심분리기를 이용하여 회수된 침전물을 동결 건조하여 시료로 사용한다.

4. 혈액 화학 분석

가. 혈중 총콜레스테롤 농도 정량

실험동물들의 혈중 총콜레스테롤 농도를 정량하기 위해 Allain 등이 제시한 방법(33)을 사용하였다. 먼저 혈장 0.01ml과 0.5ml의 콜레스테롤 측정용 효소시약(Sigma 352-50)을 1.5 ml 튜브내에서 교반반응시키고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 반응물 중 0.2 ml을 취하여 분광광도계를 사용하여 492 nm의 빛에서 흡광시킨 후 검량곡선과 비교하여 농도를 환산했다.

혈장중에 있는 cholesterol은 ester형(cholesteryl ester)과 유리형(free cholesterol)이 존재하므로 두 형태를 모두 다 정량하기 위하여 ester형의 cholesterol을 cholesterol esterase에 의해 지방산과 유리형 cholesterol로 전환시킨다. 이렇게 전환된 cholesterol과 혈장중의 유리형 cholesterol을 cholesterol oxidase에 의해 Δ4-cholesterol으로 바꾸어 peroxidase와 기질인 H₂O₂, phenol과

4-amino-antipyrine을 섞어서 적색으로 발색시켜 492 nm에서 흡광도를 측정하여 cholesterol 표준과 비교하여 정량하였다.

나. 혈중 고밀도지단백질의 콜레스테롤 농도 정량

실험동물의 혈중 고밀도지단백질의 콜레스테롤 농도를 정량하기 위해 Warnick 등이 제시한 dextran sulfate-MnCl₂ 침전법(34)을 사용하였다. 혈장 100 μ l를 취하여 인텡스텐 나트륨 500 μ g과 염화마그네슘 1 mg을 처리하면, 인텡스텐산과 마그네슘 양이온의 작용으로 lipoprotein중 apo-lipoprotein B를 가지고 있는 low density lipoprotein(LDL) 및 very low density lipoprotein(VLDL)을 침전시킨다. 실온에서 5분간 방치한 후 3,000 x g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액 5 μ l을 취하여 콜레스테롤 측정용 효소시약(Sigma 352-50) 0.5 ml과 교반시키고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 반응물 중 0.2 ml을 취하여 분광광도계를 사용하여 492 nm에서 흡광도를 측정한 후 검량곡선과 비교하여 농도를 환산하였다.

다. 혈중 중성지질농도 정량

실험동물들의 혈중 중성지질의 농도를 정량하기 위해 Allain 등이 제시한 방법(33)을 사용하였다. 혈장중에 있는 중성지질을 lipoprotein lipase(LPL)을 이용하여 글리세린과 지방산으로 분해시킨후 ATP와 Glycerol kinase(GK)를 첨가하여 L- α -phosphoglycerol로 변형시킨다. 여기에 Glycerophosphoxidase(GPO)를 첨가하여 반응시키면, H₂O₂가 발생한다. 여기에 peroxidase를 처리하여 적색으로 발색시킨 후 흡광도를 조사하였다. 먼저 혈장 0.01 ml과 0.5 ml의 중성지질 측정용 효소시약(Sigma 336-20)을 1.5 ml 튜브내에서 교반반응시키고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 반응물 중 0.2 ml을 취하여 분광광도계를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 검량곡선과 비교하여 농도를 환산한다.

라. 간조직의 GOT, GPT 측정을 통한 독성 측정

혈장에 GOT의 경우 L-아스파라긴산과 α -케토글루탈산을, GPT의 경우 DL-알라닌과 α -케토글루탈산을 넣으면 혈장의 효소에 의해 기질이 피루빈산으로 바뀌며, 이 피루빈산이 2,4-디니트로 페닐 히드라진과 반응하여 0.4 N NaOH를 처리하면 비색으로 발색반응이 나타나고 이를 490 nm-530 nm에서 흡광도를 측정하여 피루빈산 리튬의 표준 물질과 비교하여 활성도를 측정하였다.

GOT와 GPT의 경우 간세포에만 존재하는 효소로서 간조직이 손상되면 혈중으로 방출

되는 특징을 가지고 있으므로 간기능 검사의 대표적인 예로 많이 사용되어지고 있다. 따라서 GOT 및 GPT의 효소역가가 혈장에서 높으면 간의 손상이 높다는 것을 알 수 있다. 사람의 경우 GOT는 8-40 Karmen 단위, GPT는 5-30 Karmen 단위에서 정상이다.

5. Liver microsomal ACAT 활성 검색

가. ACAT의 부분 정제

ACAT 효소원으로는 흰 쥐(male Sprague-Dawley 150~200 g)의 간조직을 분리하여 (35) 생리식염수로 세척하고 4배 용량의 완충액 A (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.01 M Tris, pH 7.4)를 가한 다음 ice bath 에서 Teflon homogenizer 로 균질화하였다. 균질액을 14,000 x g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 100,000 x g 에서 1 시간동안 초원심분리하였다. 이 침전물을 완충액 B (0.25 M sucrose, 0.01 M Tris, pH 7.4)로 수세하고 분쇄시킨 후 1시간동안 100,000 x g 에서 다시 초원심분리를 행하였다. 2차로 얻은 침전물을 4 mL 의 완충액 B에 현탁시킨 후 bovine serum albumin 을 표준단백질로 사용하여 Lowry와 Rosebrough 방법(36)에 따라 단백질을 정량하고 단백질 농도가 8~10 mg/ml 가 되도록 희석하여 200 μ l씩 분취한 후 -80 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

나. ACAT의 활성 측정

ACAT 활성의 측정은 [$1-^{14}$ C] oleoyl-CoA를 기질로 하여 Brecher & Chan (37)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 10 μ l 발효 상등액, 4.0 μ l microsomal enzyme, 20.0 μ l assay buffer (0.5 M KH_2PO_4 , 10 mM DTT, pH 7.4), 40 mg/ml BSA (지방산이 제거된 것, Sigma A6003) 15.0 μ l, 20 mg/ml cholesterol 2.0 μ l, 41.0 μ l H_2O 를 가하여 37 $^{\circ}$ C 에서 15분간 예비반응시켰다. 이 반응액에 [$1-^{14}$ C] oleoyl-CoA (0.02 μ Ci, 최종농도 10 μ M) 8 μ L를 첨가하여 다시 37 $^{\circ}$ C 에서 15분간 반응시킨 후 isopropanol-heptane (4:1 ; v/v) 1 ml을 가하여 반응을 정지시키고, heptane 0.6 ml와 5배로 희석한 assay buffer 0.4 ml를 첨가한 후 원심분리를 행하였다. 효소활성의 측정은 원심분리하여 얻은 상등액 100 μ l에 cocktail(Lipoluma, Lumac Co.) 4 ml를 첨가한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다.

6. 토끼을 이용한 건강개선 약효검정

가. 실험동물, 사육환경 및 실험군

실험동물은 체중 2.5 ~ 2.6 Kg의 3개월령 뉴질랜드 백색종(New Zealand White)의 건강한 수컷 토끼를 연암 원에 축산대학으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 동물은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 및 12시간 명/암 주기로 조절되는 환경하에서 실험에 사용하였다. 식이는 수분(7.6%), 조단백질(22.8%), 조지방(2.8%), 조회분(8.8%), 조섬유(14.4%) 및 가용성무질소물(43.7%)로 구성된 토끼용 고품사료(RC4 diet, Oriental Yeast Co., Japan)에 콜레스테롤 1%가 첨가된 사료만을 섭취시키는 대조군 1군과 각 시험물질들을 일정비율로 혼합하여 병용 투여하는 실험군으로 나누었으며, 사료와 물은 충분히 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 각 군당 토끼 6마리를 사용하여 6주동안 사육하였다.

나. 혈액화학 분석

6-8 주간 사육후 ketamine (50 mg/kg)을 대퇴부에 근육주사하여 마취한 다음 각 실험군의 토끼를 희생시켜 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 2시간 정도 정치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층부의 혈청을 분리하여 초저온냉동고에 보관하였다가 혈액분석에 사용하였다. 혈액분석은 혈액화학분석기(CIBA Corning 550 Express, USA)를 이용하여 glutamate-oxalate-transferase (GOT), glutamate- pyruvate- transferase (GPT), gamma-glutamyl transferase (γ -GT), total choloesterol (TC), HDL-cholesterol(HDL), triglyceride (TG) 및 creatin kinase (CK) 등의 변화를 측정한 다음 각 실험군간의 차이를 분석하였다.

다. 대동맥내 지방선 분석

실험종료후 각 실험군 토끼들의 흉부를 절개하여 대동맥을 따라 하방으로 5 cm 정도를 절취한 후, 혈관주변부의 지방을 잘 제거하고 대동맥의 중앙부위를 종축방향을 따라 절개하여 dish에 핀으로 고정하고 사진촬영을 하였다. 지방선 염색은 Esper et al. 의 방법을 이용하여(38) 절개된 대동맥을 propylene glycol로 각각 2분씩 3회 수세하고, propylene glycol에 녹인 Oil Red O(ORO) 포화용액으로 옮겨 30분간 염색하였다. 염색된 대동맥을 85% propylene glycol로 각각 3분씩 2회 수세하여 여분의 염색액을 제거하고 생리식염수로 세척하여 사진촬영을 한 다음, tracing하여 화상분석기(LEICA, Q-600, Germany)로 전체 대동맥 면적에 대한 염색부위(지방선 부위)의 비율(%)을 계산하여 각 실험군간의 차이를 분석하였다.

라. 각 장기의 조직학적 관찰

실험종료 후 토끼 부검시 흉부를 절개하고 대동맥을 절취하여 지방선 분석에 사용하고, 곧바로 대동맥 일부와 심장, 폐, 간, 신장 및 근육 등을 절취하여 육안적으로 특이 소견의 유무를 확인한 다음, 각 장기의 1/2은 급속동결시키고 1/2은 10% 중성 포르말린에 넣어 24시간 이상 고정하였다. 고정시킨 후 각 조직들을 흐르는 물로 충분히 수세하고 70%, 80%, 90% 및 100% 알콜로 단계적으로 탈수시킨 다음 paraffin 투과과정을 거쳐 포매장치(SHANDON, Histocentre 2, USA)를 이용하여 포매하고 박절편기 (LEICA, RM2045, Germany)로 약 4 μ m의 두께로 조직절편을 제작하여 H & E (hematoxylin & eosin) 염색을 하고 xylene으로 투명화 과정을 거친 다음 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

마. 간 조직의 형태계측

고콜레스테롤 식이와 각 시험물질들의 투여가 간 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다른 연구자들의 방법들 (39,40)을 참고하여 각 실험군의 간 조직 표본을 현미경으로 관찰하여 중심정맥을 기준으로 간소엽내 비정상 지방함유세포의 분포비율 정도에 따라 1+ (0~25%), 2+ (26~50%), 3+ (51~75%) 및 4+ (75~50%)로 분류하고 점수를 산정하여 분석하였다.

바. 통계처리

본 연구를 통하여 얻어진 혈액분석치, 대동맥 지방선 및 간조직의 비정상 지방함유세포의 형태계측치 등은 컴퓨터 통계프로그램(Microsoft excel, version 7.0)을 이용하여 각 실험군간의 유의성 차이를 분석, 검정(student *t*-test)하였다.

7. 쥐를 이용한 건강개선 약효검정

가. 실험동물

체중 110~130 g 정도의 4 주령 Sprague-Dawley (SD) 수컷 랫트를 대한실험동물센터로부터 분양받아 온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 및 12 시간의 명/암 주기로 조절되는 사육환경하에서 사육하면서 실험을 수행하였다. 실험군은 vitamin free casein (21%), sucrose (15%), solka floc (3%), vitamin mix (2%), mineral mix (5%), D,L-methionine (0.15%), sodium cholate (0.5%), dextrin (32.15%), lard (20%) 및 choline chloride (0.2%) 등에 1% cholesterol이 함유되어 있는 실험용 분말사료 (Test diets 5799M-B, PMI, USA)를 섭취시키는 대조군 1개군과 시험물질들을 일정 비율로 혼합하여 섭취시키는 3개군의 실험군을 포함하여 총 4개군으로 나누어 총 6주

동안 투여하였다. 실험전기간에 걸쳐 사료와 물은 자유롭게 충분히 섭취할 수 있도록 하였다.

나. 혈액화학분석

실험종료 후 diethyl ether로 흡입마취하여 심장으로부터 혈액을 채취하여 2시간 정도 정치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층부의 혈청을 분리하여 초저온냉동고에 보관하였다가 혈액분석에 사용하였다. 혈액분석은 glutamate-oxalate-transferase (GOT), glutamate- pyruvate- transferase (GPT), total choloesterol (TC), triglyceride (TG) 및 creatin kinase (CK) 측정용 시약들 (Chiron Diagnostics Co., USA)을 사용하여 각 실험군의 혈청으로부터 혈액화학분석기 (CIBA Corning 550 Express, USA)로 직접 측정하였다. 또한 high density lipoprotein (HDL)을 분석하기 위하여 각 실험군의 혈청에 dextran sulfate와 magnesium sulfate를 넣어 LDL과 VLDL을 침전시킨 다음 상청액내의 HDL을 측정하는 방법 등^{1~3)}을 응용하여 만든 HDL 측정용 시약 (Chiron Diagnostics Co., USA)을 혈청과 1:10의 비율로 혼합한 다음 20~25℃ 정도의 incubator에서 5 분간 반응하고 원심분리기로 2,500 rpm에서 10분간 원심하여 얻어진 상청액을 혈액화학분석기로 옮겨 측정하였다.

다. 조직학적 관찰

랫트의 각 장기와 조직에 대한 영향을 조사하기 위하여 대동맥, 심장, 폐, 간, 신장 및 근육 등을 절취하여 특이소견의 유무를 확인한 다음 10% 중성 포르말린에 넣어 24시간 이상 고정시킨 후, 흐르는 물로 충분히 수세하고 70%, 80%, 90% 및 100% 알콜로 단계적으로 탈수시킨 다음 paraffin 투과과정을 거쳐 포매기 (SHANDON, Histocentre 2, USA)를 이용하여 포매하였다. 포매된 조직은 박절편기 (LEICA, RM2045, Germany)로 약 4 μ m의 두께로 조직절편을 제작하여 H & E (Hematoxylin & eosin) 염색을 하고 xylene으로 투명화 과정을 거쳐 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

라. 통계처리

본 연구를 통하여 얻어진 혈액화학분석치 등은 컴퓨터 통계프로그램 (Microsoft excel, version 7.0)을 이용하여 각 실험군 간의 유의성 차이를 분석·검정 (student *t*-test)하였다.

8. 고혈압쥐의 혈압 및 심박수에 미치는 영향 조사

(한국화학연구소 의약활성연구실에 실험을 의뢰하였음)

가. 실험재료 및 실험동물

실험동물로 사용한 선천성고혈압쥐(SHR)는 일본 Charles River 사로부터 구입하였으며 웅성 Sprague-Dawley 흰쥐는 한국화학연구소 안전성 센터에서 SPF 상태로 사육한 4 주령을 분양받아 일정한 온도와 습도를 유지한 일반 사육실에서 (12 hr light, 12 hr dark cycle)에서 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 사육한 후 각각 12 주령 및 350-450 g이 되었을 때 실험에 사용하였다.

나. 시약 및 기구

시험물질인 진피 ethanol extract는 증류수에 현탁하고, hesperidin은 0.5% CMC에 현탁하여 동물실험에 사용하였다. 기기는 Modular signal processing center (Modular, USA), Isotech pressure transducer (Hugosachs, Germany), Illuminator (Dolan-Jenner Industries, Inc, USA) 등을 사용하였다.

다. DOCA/salt 고혈압쥐 확립

Sprague-Dawley rat의 우측 대퇴부 피하에 100 mg deoxycorticosterone acetate pellet (Innovative Research of America, USA)을 이식시키고 autoclip으로 봉합했다. 4 주간 1% NaCl을 경구투여한 후 평균동맥압이 170 mmHg 이상으로 상승된 동물에 대해 시료에 대한 혈압강하 작용 평가에 사용하였다.

라. 신성 고혈압쥐 (renal hypertension rat) 확립

한국화학연구소 안전성 센터에서 구입, 사육한 흰쥐(350-450 g)를 ether로 마취시키고 좌복부에 세로로 1 cm 가량 절개한 다음 복부 대동맥 가까운 신동맥을 조심스럽게 분리하여 봉합사 (4/0 sterile surgical silk, Ethicon)로 신동맥을 완전히 결찰하고 needle이 달린 봉합사로 근육층 및 피부를 봉합하였다. 결찰 6-8 일 후 수축기 혈압이 180 mmHg 이상인 동물을 신성고혈압모델로 실험에 사용하였다.

마. 비마취 DOCA/salt 고혈압쥐, SHR 및 RHR에 대한 혈압 및 심박수 측정

시험물질을 경구로 투여한 후 catheter를 통한 직접법으로 측정하였다. 흰쥐를 ketamine hydrochloride (125 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 다음 polyethylene tubing 50

(PE50)을 PE10에 연결한 catheter에 heparinized saline 용액을 채워서 대퇴 동맥을 cannulation하여 목 뒤에 고정된 catheter를 Isotec pressure transducer에 연결하여 Modulator signal processing center를 이용하여 혈압 및 심박동수를 측정하였다. 약 1 시간 혈압이 안정된 것을 확인한 후 시험물질을 용량별로 경구 투여한 후 일정시간 간격으로 투여 후 24 시간까지 혈압 및 심박동수를 측정하여 그 결과를 약물 투여 전의 혈압 및 심박수의 변화률로 나타내었다.

제 2 절 연구개발 수행 결과

1. CETP 저해제의 탐색

농산물 및 식용재료로부터 콜레스테롤 전이단백질(CETP) 저해활성성분 탐색 및 콜레스테롤 합성 저해(HMG CoA reductase 활성저해제) 활성 성분을 탐색하였다.

가. CETP 활성저해물질의 탐색

서양의학에서는 심장순환기 질환의 원인을 분자생물학에 기초한 발병작용을 연구하고 이에 관여하는 효소나 수용체 등을 선택적으로 억제하는 방법을 도입하여 신약개발을 서두르고 있다. 대표적인 성공사례로는 콜레스테롤 생합성에 관여하는 중요한 효소인 HMG-CoA reductase 저해제를 들 수 있는데, 현재 Mevacor란 상품명으로 개발에 성공한 이 제품은 연간 1조 3000억원의 시장을 점유하고 있으며 투여시 혈중 저밀도지단백질을 25%, 총콜레스테롤치를 15% 정도 낮출 수 있는 것으로 보고되어 있고, 한편으로는 squalene synthetase 저해제 탐색을 통해 콜레스테롤이 몸속에서 생합성되는 경로를 조절하여 혈중 콜레스테롤의 양을 줄이려는 방법과 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 저해제 탐색을 통해 음식을 통해 들어온 콜레스테롤이 몸속으로 흡수되는 양을 줄이고자 하는 노력이 활발히 진행되고 있다. 최근에는 콜레스테릴 에스터를 혈중의 고밀도 지단백질(HDL)로부터 저밀도 지단백질(LDL)로 전이시키는데 작용하는 cholesteryl ester transfer protein(CETP)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이 CETP의 작용은 동맥경화 및 다른 심혈관 질환과 직접적인 관계가 있다.

지금까지 많은 연구개발의 노력이 진행되었지만 근본적으로 서양의학이 지향하는 치료제 개발전략이 심장순환기 질환 모델에는 만족할만한 결과를 보여주지 못하고 있다. 따라서 치료제보다는 병의 진전을 억제하는 예방차원의 활성물질 및 제제개발이

요구되고 있다. 특히 동양에서는 식품의 섭취를 통해 병증세를 완화하거나 예방하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 동의보감 및 민간요법에서 활용되고 있는 콜레스테롤 저하, 고혈압 및 혈류 개선에 유효한 약용식물과 식용식물을 중심으로 여러 가지 천연자원을 전국 각지로부터 수집하여 유기용매를 이용한 식물체 추출액의 CETP 저해활성을 탐색하고, 이 결과를 *in vivo* 동물실험에 필요한 기초자료로 삼고자 했다. 표 8에 나타낸 바와 같이 90 여 가지의 식물체로부터 50%-75% CETP 저해활성을 나타내는 시료는 20%, 75% 이상의 CETP 저해활성을 나타내는 시료는 16%이었다.

CETP 저해활성을 나타내는 시료중에서 linoleic acid(CETP IC₅₀ value 29.3 μ M)나 linolenic acid(CETP IC₅₀ value 35.7 μ M)를 포함하는 의사 CETP 저해물질을 선별하여 배제하여야한다.

표 8. 식물소재로부터 CETP 활성저해제 탐색 결과

No.	시료명	Inhibition	No.	Inhibition	시료명
1	참겨	★★	21	조각자	
2	겨잎		22	자골피	
3	백령		23	감황	★★
3	비파잎	★★	24	함환피	
5	마름	★★	25	승마	
5	천산롱		26	백굴채	
7	마미련		27	목방기	
7	무화과		28	생강	★
9	딸기뿌리	★★	29	감자	★
10	뽕나무뿌리		30	당근	
11	가근피		31	머위잎	
12	오근피		32	약콩	★
13	천남성		33	동겨	
14	축근류		34	대추	★★
15	토우슬		35	탱자	
16	마늘	★	36	후박잎	★★
17	나문재		37	송악	
18	오미자	★	38	긴담배풀	★★
19	고미신	★★	39	도라지	★★
20	자유	★★	40	늪은호박	
★: 50-75% inhibition, ★★: 75% 이상 inhibition.					

표 8. 식물소재로부터 CETP 활성저해제 탐색 결과 (계속)

No.	시료명	Inhibition	No.	Inhibition	시료명
41	도토리		66	고로쇠	★
42	상수리		67		
43	박하		68	고사리	
44	대추잎		69	갈대	★
45	감잎		70	돛나물	★
46	익모초	★	71	쑥	
47	뽕나무잎		72	쑥	
48	케일잎	★	73	표고버섯	
49	척잎	★	74	민들레뿌리	
50	구기자잎		75	할미꽃	
51	은행잎	★	76	아욱	★
52	아주까리잎		77	민들레	
53	아주까리열매		78	천궁	
54	쇠뜨기		78	작약	
55	쑥잎	★	80	황자	
56	비듬나물		81	백출	
57	구기자열매		82	독활	★
58	봉숭아	★	83	당귀	
59	알로에	★★	84	동충하초	
60	신선초	★★	85	새삼	★★
61	인삼	★★	86	약쑥	
62	양파	★	87	자주깽다리	
63	꽃갯잎		88	삼릉	★
64	층약		89	신이	
65	냉이		90	괘루근	

★: 50-75% inhibition, ★★: 75% 이상 inhibition.

나. CETP 활성 저해물질들의 분리·정제

대추로부터 CETP 활성 저해물질의 분리

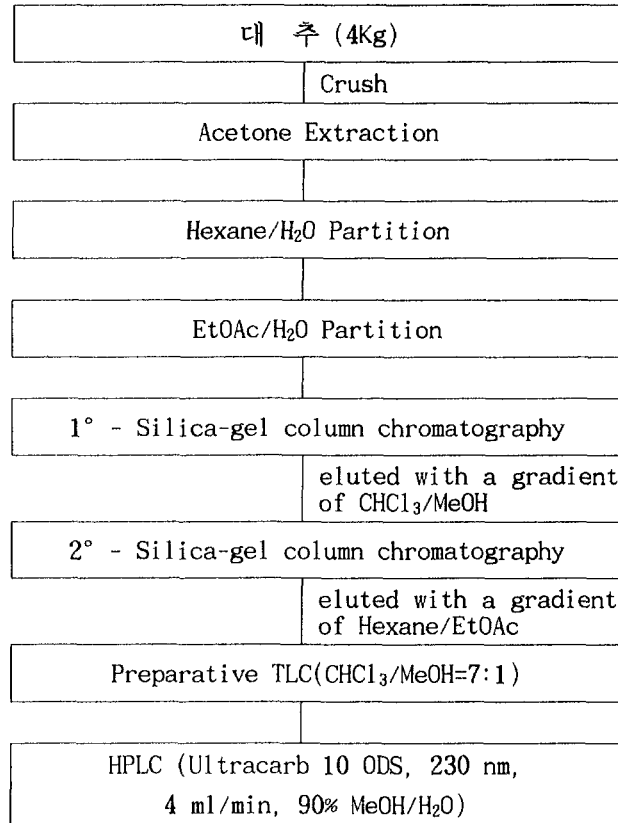


그림 1. 대추로부터 CETP 저해 활성성분의 분리·정제 방법

연산에서 생산된 대추(40 Kg)의 과육을 2-3등분 한 후, 동량의 부피로 acetone/H₂O(10:1)을 첨가하여 실온에서 3-4일간 방치하면서 추출하였다. 같은 방법으로 2회 추출한 후, 추출액을 모아서 감압하에 농축하여 수화상태의 짙은 갈색 농축액을 얻었다. 이 수화상태의 짙은 갈색 농축액에 hexane을 동량으로 3번 첨가하여 분배추출함으로써 CETP에 *in vitro* 상에서 강한 저해활성을 나타내는 지방산 계열의 물질(CETP에 대한 IC₅₀치가 20-30 μM임)을 제거하고자 하였다. Hexane층을 제거한 H₂O층에 다시 ethyl acetate를 동량으로 3번 첨가하여 분배추출하였다. Ethyl acetate 추출액을 모아서 감압하에 농축하여 분말 상태의 연한 갈색물질 83.6 g을 얻

었다. 이 ethyl acetate층의 연한 갈색물질은 36.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 CETP 활성을 50% 억제하였다. Silica-gel (E. Merck, silica gel 60, 230-400 mesh)에 연한 갈색 물질(4.11 g)을 흡착시킨 후 CHCl_3 -MeOH의 비율을 변화시키면서 1차 flash column chromatography를 이용하여 활성분획을 분리한 후, Hexane-ethyl acetate의 비율을 변화시키면서 2차 flash column chromatography를 이용하여 활성분획을 분리하였다. 다음 단계로 preparative TLC (전개용매 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=7:1$)를 이용해서 분리하고 최종적으로 HPLC (Phenomenex, Ultracarb 10 ODS, 250x21.2 mm, 90% MeOH/ H_2O at 230 nm)를 이용해서 순수물질을 얻었다. 대추로부터 CETP 저해 활성성분의 분리·정제 방법을 종합하면 그림 1과 같다.

생강으로부터 CETP 활성 저해물질의 분리

생강은 대한민국 충청남도 아산에서 구입하여 사용하였다. 구입한 생강을 잘 씻어서 녹즙기를 사용하여 파쇄하였다. 3 kg의 분쇄된 생강에 6L의 아세톤을 넣어 상온에서 24시간 교반한 후 여과지를 이용하여 액상과 고체부분을 분리하였다. 액상을 모아서 감압하에서 농축 한후 2L의 에칠아세테이트를 3회 첨가하여 물층과 유기용매층으로 분리하고, 분액 깔대기를 이용하여 유기용매층과 물층을 분리하여 효소 활성 저해도를 측정한 결과 유기용매층에 활성물질이 함유되어 있음을 확인하였다. 활성 물질을 함유하고 있는 유기용매층을 모은 후 감압하에 농축, 건조하여 황갈색의 유성 물질을 얻었다. 실리카겔 (Merck, Art No.9385)에 유성물질을 흡착시킨 후 헥산과 에칠아세테이트의 비율을 변화시키면서 실리카겔 컬럼 크로마토 그래프를 이용해 활성 분획을 2회반복 분리한 후 최종적으로 HPLC를 이용하여 순수한 [10]-Dehydrogingerdione과 [6]-Dehydrogingerdione을 정제하였다. 이때 HPLC 컬럼으로는 페노메넥스(phenomenex)사의 울트라카브(ultracarb) 10 ODS(250 x 21.2 mm)를 사용하였으며 활성물질들은 80% 아세토 나이트릴과 20% 물의 용매로 용출시켰다. 최종적으로 분리된 순수한 [10]-Dehydrogingerdione과 [6]-Dehydrogingerdione은 생강 kg당 각각 2, 40mg의 수율을 얻었다 (그림 2).

UV 흡광도 분석은 Shimadzu UV-265 spectrophotometer로 측정하였으며, IR 흡광도는 Bio-Rad Digilab Division FTS-80 spectrophotometer로 측정하였고, VG70-SEQ mass spectrometry를 이용하여 High resolution MS를 측정하여 분자량 및 분자식을 결정하였다. [10]-Dehydrogingerdione 과 [6]-Dehydrogingerdione의 분자량은 346과 290 이고 분자식은 $\text{C}_{21} \text{H}_{30} \text{O}_4$ 와 $\text{C}_{17} \text{H}_{22} \text{O}_4$ 로 측정되었다.

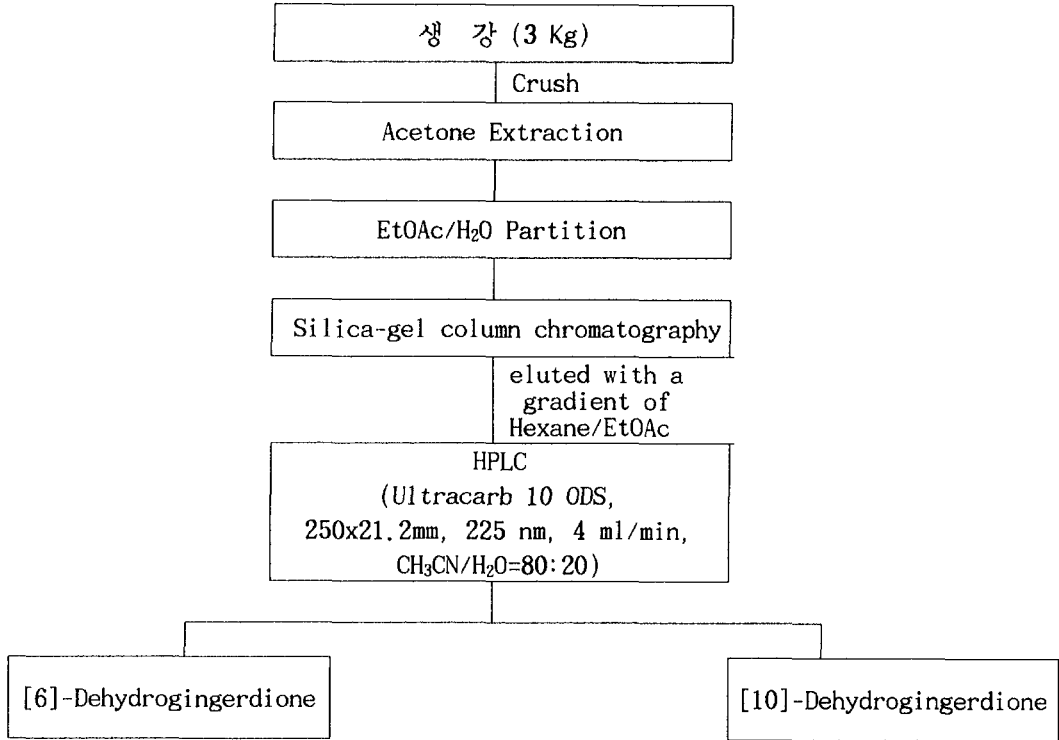
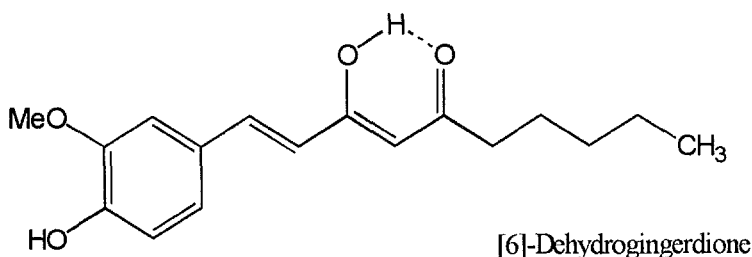
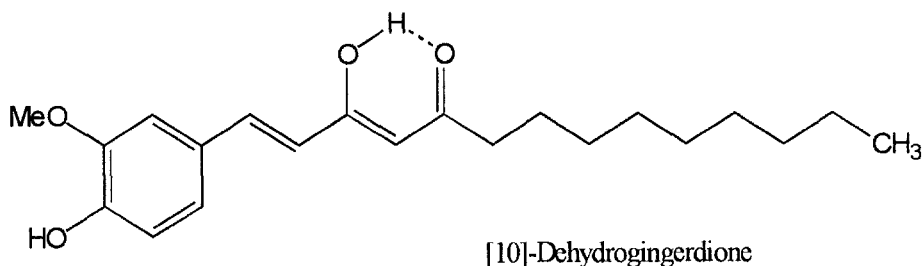


그림 2. 생강으로부터 CPTP 저해 활성성분의 분리·정제 방법

또한 핵자기공명기(Bruker 300 MHz, 500 MHz NMR)를 이용하여 ^1H , ^{13}C , C-H Cosy, HMQC, NOE spectrum을 얻었으며, 이들 spectra를 종합적으로 분석하여 [10]-Dehydrogingerdione과 [6]-Dehydrogingerdione의 구조를 결정하였다. [10]-Dehydrogingerdione은 질량분석기에 의하여 분자량이 346, High resolution Mass에 의하여 Molecular formular는 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$ 로 추정되었다. 500 MHz ^1H -NMR에서 고자장부분의 δ 2.35(2H, t, $J=7.8\text{Hz}$), δ 1.62(2H, m), δ 1.33(2H, m), δ 1.26(10H, m)과 δ 0.86(3H, t, $t=6.9\text{Hz}$)는 긴사슬형태의 부분구조로 추정되었다. 그리고 δ 7.06(1H, dd, $J=9.3, 2.0\text{Hz}$), δ 7.00(1H, d, $J=2.0\text{Hz}$)과 δ 6.9(1H, d, $J=8.3\text{Hz}$)는 1,2,4-trisubstituted phenyl group의 전형적인 형태로 나타났다. ^1H -NMR의 δ 6.9와 δ 7.06의 J 값이 같은 8.3Hz로 측정되었으므로 근접한 proton임을 나타냈으며 δ 7.00가 δ 7.06의 J 값이 2.0Hz로 두proton 이 근접한 proton임을 나타냈다. δ 7.50과 δ 6.32의 J 값이 15.6Hz인 긴 연결상수는 E-형태의 이중결합으로 추정되었다. C-H COSY에서 ^{13}C NMR의 δ 100.10 signal과 ^1H NMR의 δ 5.60(1H, s)의 상관관계에서 α, β -불포화 carbonyl group의 α -위치로 보여졌다.



저자장에서 나타나는 ^1H 과 ^{13}C NMR에서 olefin의 methine은 ether나 hydroxyl과 같은 강한 전기음성 group과 연결되어 있을 것으로 보여졌다. ^{13}C 의 δ 177.95에서 나타나는 signal은 지금 상태에서는 알 수 없었다. 다른 부분구조는 7,8,9Hz을 조사하여 HMBC 시험을 통하여 aromatic proton들과 이웃한 carbon들의 관계에서 tri-substituted phenyl ring으로 결정할 수 있었다. δ 3.91의 methoxy proton은 δ 146.69와의 관계에서 aromatic ring의 C-2에 붙어있음을 보여주었고 δ 7.50과 δ 6.32의 이중결합으로 나타나는 olefin proton의 coupling은 aromatic ring의 C-4 위치에 붙어있는 것으로 나타났다. 한편 δ 200.09와 δ 100.10과 coupling하는 δ 2.35의 methylene proton은 $\alpha \cdot \beta$ -불포화 이중결합으로 aliphatic chain에 붙어 있었다. 그리고 olefinic proton과 δ 177.95의 저자장의 탄소의 coupling은 aliphatic chain의 styrenyl 부분에 붙어 있음을 알 수 있다. ^1H NMR spectrum에서는 hydroxyl proton peak이 나타나지 않았지만 C-3'와 C-4' 탄소와의 chemical shifts로부터 II-electron resonance에 의한 부가 안정화는 이를 뒷받침하였다. 절대구조를 알기 위하여 NOESD 시험을 통하여 구조를 결정하였다. methoxy proton들의 3.92ppm을 조사하면 H-3 proton(7.00ppm)이 증가되어 methoxy group과 H-3 proton 이 공간적으로 가까운 형태로 나타났다. 그리고hydroxyl과 methoxy group은 aromatic ring의 C-1과C-2에 붙어있는 것으로 나타났다. C-4에 결합되어있는 olefine proton을 조사하면 aromatic ring

의 H-3와 H-5의 proton peak들의 증가에서 H-3와 H-5의 위치를 알 수 있었다. 또한 H-2'와 H-4' 사이의 NOE의 상관관계는 C-3'의 이중결합의 Z-형태임을 알 수 있었다. 그리고 [6]-Dehydrogingerdione의 구조분석은 이상의 결과를 참고하여 결정하였으며 [10]-Dehydrogingerdione과 구조적 유사체로 [10]-Dehydrogingerdione 분자에서 4개분의 CH₂가 적은 구조로 분자량은 290이고 분자식은 C₁₇ H₂₂ O₄로 측정되었으며 gingerol계의 물질로 결정할 수 있었다.

콜레스테릴 에스테르 전이단백질(CETP) 저해활성의 측정을 측정한 결과, [10]-Dehydrogingerdione의 IC₅₀ 치는 35 μM이고, [6]-Dehydrogingerdione의 IC₅₀ 치는 120 μM이었다.

2. 감귤류 과피의 Flavonoids 함량 분석 및 대량 추출 방법 확립

가. 감귤류 과피의 Flavonoids 함량 분석

제주도산 감귤 과피를 건조한 후 건조 감귤류 과피 500 g에 30% 에탄올 용액 5ℓ를 가하고 60℃에서 5시간 동안 추출하였다. 이 추출물을 면직물(cotton cloth)을 이용하여 여과한 다음 여액을 진공농축하여 190 g의 시럽상의 추출물을 얻었다. 상기와 같이 얻어진 과피 추출물의 성분을 조사하기 위하여 다음과 같은 조건으로 HPLC 분석을 실시하였다. 상기 검액 5.0 μl를 37% 메탄올로 미리 평형화된 리크로스브(Lichrosorb) RP-8 컬럼(5 μm, 4 x 250 mm)이 장착된 HPLC에 주입하였다. 이 때 컬럼의 온도는 30℃로 조절하고, 37% 메탄올을 이동상으로 사용하여 1.0 ml/분의 유속으로 용출시켰다. 따로, 헤스페리딘과 나린진(Sigma Co.) 표준품을 메탄올에 용해시켜 최종 농도가 각각 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 mg/ml 가 되도록 표준용액을 조제하여 동일한 조건에서 HPLC를 실시하였다(Fig. 3). 용출물을 UV-VIS 분광광도계(spectrophotometer)를 사용하여 280 nm에서 검출하고, 검량선과 과피추출물의 HPLC 프로파일(profile)의 면적을 비교 분석하여 추출물중 헤스페리딘의 함량을 측정한 결과, 이 추출물 190 g 속에는 헤스페리딘 5.1 g이 들어 있었다. HPLC를 이용하여 추출물의 성분을 분석한 결과, 수분 65%, 당분 28%(과당 11%, 포도당 11%, 슈크로스 6%), 헤스페리딘 2.7% 및 기타 회분 등의 미량성분으로 구성되어 있었다.

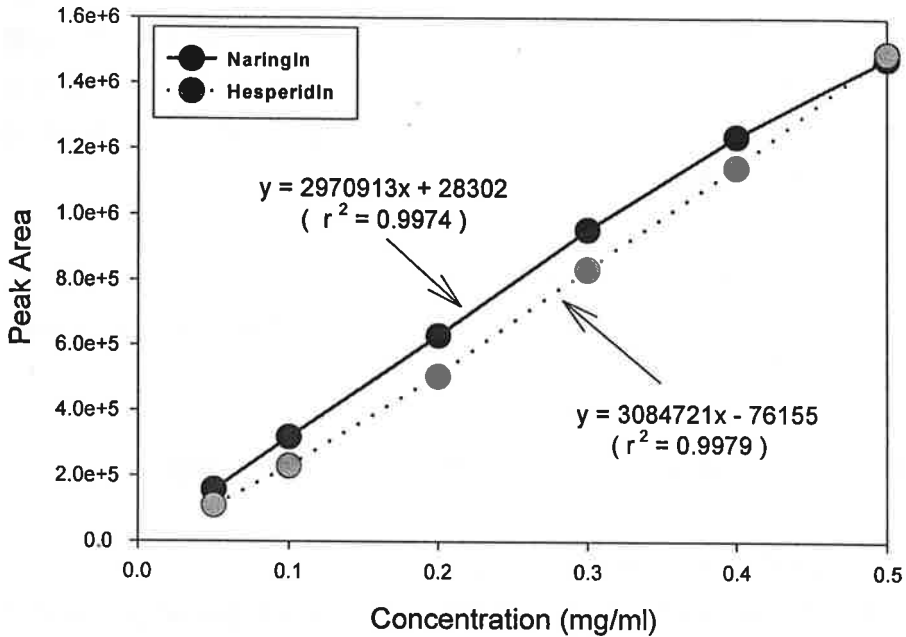


Fig. 3. Standard curve of naringin and hesperidin.

제주도에서 구입한 재래 감귤인 산물, 스타치, 청귤, 병귤, 은주, 당유자, 하귤, 한라봉을 대상으로 위와 같은 방법으로 flavonoids를 추출하여 naringin과 hesperidin의 함량을 조사하였다. 그림 4에서 보이는 것처럼, 산물 (3.28%), 스타치 (0.52%), 청귤 (2.46%), 은주 (4.42%), 한라봉 (0.63%)은 hesperidin만을 함유하고 있으며, 하귤은 naringin(3.26%)만을 함유하고 있다. 반면에 병귤은 naringin과 hesperidin을 모두 함유하고 있으나, 상대적으로 다른 감귤류에 비해 함량이 적었다. 감국피 건조 무게 당 은주의 hesperidin 함량이 가장 높았으며, naringin은 하귤에 가장 많이 함유되어 있었다. 또한 협동연구기관인 충남대 연구결과에 따르면 수확기에 다른 naringin과 hesperidin의 함량에 큰 차이가 있는 것으로 나타났다.

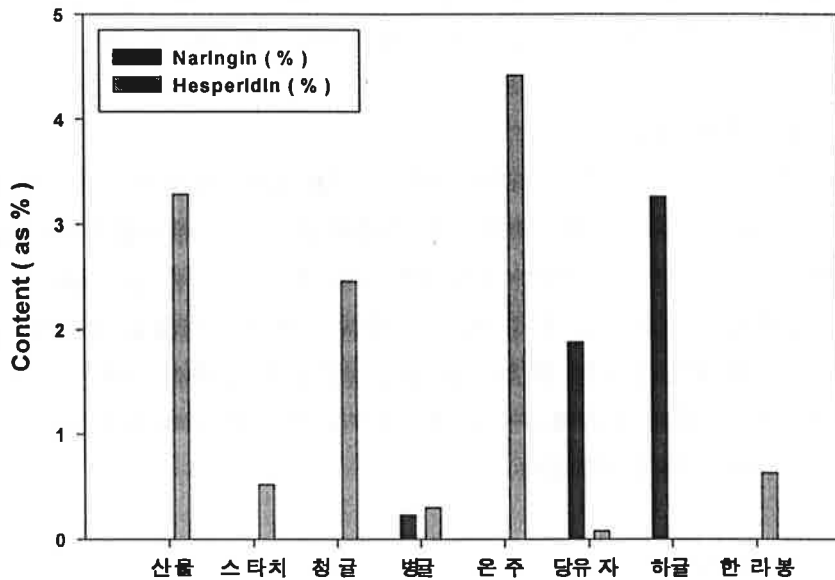


Fig. 4. Contents of Naringin or Hesperidin in citrus peel.

나. 감귤과피로부터 Flavonoids의 대량 추출 방법 확립

(1) 에탄올을 이용한 방법

제주도산 감귤 껍질을 건조한 후 건조 감귤류 과피 500 g에 30% 에탄올 용액 5 l를 가하고 60℃에서 5시간 동안 추출하였다. 이 추출물을 면직물(cotton cloth)을 이용하여 여과한 다음 여액을 진공농축하여 190 g의 시럽상의 추출물을 얻었다. 상기와 같이 얻어진 과피 추출물의 성분을 조사하기 위하여 다음과 같은 조건으로 HPLC 분석을 실시하였다. 상기 검액 5.0 μ l를 37% 메탄올로 미리 평형화된 리크로스브(Lichrosorb) RP-8 컬럼(5 μ m, 4 x 250 mm)이 장착된 HPLC에 주입하였다. 이 때 컬럼의 온도는 30℃로 조절하고, 37% 메탄올을 이동상으로 사용하여 1.0 ml/분의 유속으로 용출시켰다. 따로, 헤스페리딘과 나린진(Sigma Co.) 표준품을 메탄올에 용해시켜 최종 농도가 각각 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 mg/ml 가 되도록 표준용액을 조제하여 동일한 조건에서 HPLC를 실시하였다. 용출물을 UV-VIS 분광광도계(spectrophotometer)를 사용하여 280 nm에서 검출하고, 검량선과 과피추출물의 HPLC

프로필(profile)의 면적을 비교 분석하여 추출물 중 헤스페리딘의 함량을 계산한 결과, 이 추출물 190 g 속에는 헤스페리딘 5.1 g이 들어 있었다. HPLC를 이용하여 추출물의 성분을 분석한 결과, 수분 65%, 당분 28%(과당 11%, 포도당 11%, 슈크로스 6%), 헤스페리딘 2.7% 및 기타 회분 등의 미량성분으로 구성되어 있었다.

(2) Ca(OH)₂를 이용한 방법

제주도산 감귤 껍질을 건조한 후, 건조된 감귤류 과피 500 g에 0.5% Ca(OH)₂ 용액 5 ℓ를 가하고 상온에서 저어주면서 1시간 동안 추출하였다. 이 추출물을 면직물로 여과한 후 여액에 1N HCl 용액을 가하여 혼합액의 pH가 4.0~4.5, 또는 6.80~7.0이 되게 한 후 5℃ 냉장실에서 24시간 방치하였다. 이때 생성된 침전물을 회수한 후 건조하여 각각 5 g 및 10 g의 건조된 분말을 얻었다. 침전된 분말을 상기 (1)에서와 같이 HPLC로 정량분석한 결과 헤스페리딘이 각각 3.2 g 및 6.55 g 포함되어 있어, 헤스페리딘의 순도는 각각 64% 및 65%였다.

(3) NaOH를 이용한 방법

제주도산 감귤 껍질을 건조한 후, 건조된 감귤류 과피 500 g에 0.5% NaOH 5 ℓ를 가하고 상온에서 저으면서 1시간 동안 추출한 다음 면직물로 여과하였다. 여액에 1 N HCl 용액을 첨가하여 혼합액의 pH가 4.0~4.5 또는 6.8~7.0이 되게 한 후 5℃ 냉장실에서 24시간 방치하였다. 이때 생성된 침전물을 회수한 후 건조하여 각각 44 g 및 49 g의 건조분말을 얻었다. 건조 분말로부터 HPLC에 의해 각각 13.6 g, 9.8 g의 헤스페리딘을 회수하였다(순도: 각각 31%, 20%)

결론적으로 보면 알카리 처리 방법이 효율적인 방법이 될 수 있음을 알 수 있고, 고순도를 얻기 위해 Ca(OH)₂에 의한 침전물 생산 방법이 우수하였다. 상기 방법들은 대량생산에 응용될 수 있다. 앞으로 과피 속에 플라보노이드가 10% 이상 들어있는 당유자 등 토종 감귤피를 개발하거나, 이들의 미숙 과피를 원료로 사용할 경우 총 회수량과 회수율, 순도 등이 크게 증가할 것이다.

3. 토끼를 이용한 flavonoids 투여에 따른 고지혈증 및 동맥경화 예방 및 치료 활성 검증 (일부 연구결과의 특허출원이 진행중이어서 naringin, hesperidin 이외의 귤피 flavonoids는 code name을 사용하였다.)

가. 1차 실험

체중 2.5~2.6 kg의 3 개월령 뉴질랜드 백색종 (New Zealand White)의 건강한 수컷 토끼를 연암축산대학으로부터 분양받아 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 및 12 시간 명/암 주기로 조절되는 사육환경하에서 실험하였다. 동물들은 수분 (7.6%), 조단백질 (22.8%), 조지방 (2.8%), 조회분 (8.8%), 조섬유 (14.4%) 및 가용성무질소물 (43.7%) 등으로 구성된 토끼용 고품사료 (RC4 diet, Oriental Yeast Co., Japan)에 1% cholesterol이 첨가된 사료를 섭취시키는 대조군 1개군과 lovastatin 및 naringin (JBB-1), hesperidine (JBB-3), JBB-5, JBB-6, JBB-7, JBB-10을 일정비율로 혼합하여 투여하는 실험군을 포함하여 총 8개군으로 나누어 6주간 실험하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다 (표 9).

표 9. JBB-1, 3, 5, 6, 7, 10 투여 실험의 식이 조성 (6 주간)

Groups (n=6)	투여식이
Control	1% 콜레스테롤 식이
Lovastatin	1% 콜레스테롤 + lovastatin (1 mg/kg) 식이
JBB-1	1% 콜레스테롤 + JBB-1 (0.1%, wt/wt) 식이
JBB-3	1% 콜레스테롤 + JBB-3 (0.1%, wt/wt) 식이
JBB-5	1% 콜레스테롤 + JBB-5 (0.1%, wt/wt) 식이
JBB-6	1% 콜레스테롤 + JBB-6 (0.05%, wt/wt) 식이
JBB-7	1% 콜레스테롤 + JBB-7 (0.1%, wt/wt) 식이
JBB-10	1% 콜레스테롤 + JBB-10 (0.1%, wt/wt) 식이

1) 혈액화학 분석

혈액화학 분석을 통한 혈중 콜레스테롤 및 지방의 변화, 대동맥내 지방선의 관찰, 간조직내 지방 함유 비정상 세포를 분석한 결과를 다음에 요약하였다.

표 10. 고콜레스테롤 식이를 시행한 토끼에서의 각 시험물질의 부여효과에 대한 혈액 화학 분석 결과

Test Compounds	혈액분석결과						
	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	γ -GTP	CK (U/l)
Control (n=5)	32.9 $\pm 5.5^a$	1143.2 ± 260.6	55.8 $38.2 \pm$	76.8 ± 8.2	65.2 ± 9.0	4.20 ± 0.89	4464.5 ± 2276.4
Lovastatin (n=5)	97.7 $\pm 37.9^*$ (P=0.009)	1209.5 ± 263.3 (P=0.377)	65.6 ± 16.9 (P=0.348)	125.6 ± 18.6 (P=0.0003)	72.5 ± 9.3 (P=0.193)	12.36 ± 0.75 (P=0.0001)	6583.4 ± 945.8 (P=0.124)
JBB-1 (n=6)	69.1 ± 57.3 (P=0.128)	1367.2 ± 141.7 (P=0.057)	72.5 ± 24.0 (P=0.199)	77.8 ± 15.7 (P=0.452)	47.5 ± 14.2 (P=0.060)	8.38 ± 5.22 (P=0.115)	4662.6 ± 1349.7 (P=0.500)
JBB-3 (n=6)	73.4 $\pm 31.6^*$ (P=0.023)	1128.8 ± 499.3 (P=0.480)	40.6 ± 15.9 (P=0.242)	75.8 ± 40.6 (P=0.480)	69.4 ± 24.2 (P=0.399)	11.94 ± 3.45 (P=0.007)	6300.2 ± 2562.5 (P=0.211)
JBB-5 (n=6)	48.5 ± 16.2 (P=0.052)	1107.8 ± 384.0 (P=0.442)	37.1 ± 15.9 (P=0.197)	96.6 ± 73.30 (P=0.282)	56.2 ± 14.5 (P=0.196)	14.51 ± 7.01 (P=0.022)	6446.2 ± 1822.1 (P=0.150)
JBB-6 (n=6)	84.8 ± 70.4 (P=0.096)	1292.5 ± 89.4 (P=0.160)	78.8 ± 43.9 (P=0.214)	52.8 $\pm 22.6^*$ (P=0.036)	41.6 ± 20.6 (P=0.072)	7.84 ± 5.37 (P=0.156)	3210.1 ± 841.1 (P=0.094)
JBB-7 (n=6)	68.8 $\pm 31.6^*$ (P=0.033)	1166.3 ± 311.3 (P=0.446)	33.0 ± 13.0 (P=0.100)	77.5 ± 11.3 (P=0.458)	21.8 $\pm 13.7^*$ (P=0.003)	7.48 ± 2.93 (P=0.058)	4674.3 ± 1617.0 (P=0.497)
JBB-10 (n=6)	64.1 $\pm 25.4^*$ (P=0.027)	789.2 ± 430.6 (P=0.115)	35.3 ± 18.4 (P=0.181)	87.2 ± 19.1 (P=0.452)	33.9 $\pm 9.9^*$ (P=0.004)	1.92 ± 1.33 (P=0.115)	5572.0 ± 2945.0 (P=0.339)

모든 측정 값은 Mean \pm SD로 나타내었음.

*: 대조군과 비교하여 $p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$ (student t-test) 수준에서 유의성 차이가 있는 것을 나타냄.

① 혈청내 HDL은 대조군에 비하여 2군(lovastatin, $p < 0.01$), 4군(JBB-3, $p < 0.05$), 7군(JBB-7 $p < 0.05$) 및 8군(JBB-10 $p < 0.05$)에서 유의성 있게 증가된 양상을 보였다. 나머지 실험군에서는 유의성있는 변화는 없었으나 대조군보다 전반적으로 증가된 결과를 보였다.

② 혈청내 총콜레스테롤과 중성지질의 경우에는 모든 실험군에서 유의성 있는 차이

를 발견할 수 없었으나, 총 콜레스테롤은 대조군에 비하여 8군(JBB-10)에서, 중성지질은 5군(JBB-5), 7군(JBB-7) 및 8군(JBB-10)에서 감소된 결과를 나타내었다.

③ 간세포의 기능손상과 관련된 GOT는 대조군에 비하여 2군(lovastatin, $p < 0.01$)에서 의미있게 증가되어 lovastatin이 간에 독성이 있음을 암시하였으며, 6군(JBB-6, ($p < 0.05$))에서 유의성이 있는 감소를 보여 간보호작용이 높은 것으로 생각되었으며, 나머지 실험군의 경우에는 대조군과 큰차이를 보이지 않았다. GPT의 경우에도 유의성은 없었으나 2군에서 가장 높은 값을 나타내어, lovastatin의 간독성이 심한 것으로 생각되었고, 이와는 반대로 7군(JBB-7, $p < 0.01$) 및 8군(JBB-10, $p < 0.01$)에서는 대조군에 비하여 절반이하의 정도도 의미 있게 낮은 값을 보여 간 보호효과가 높은 것으로 사료된다.

④ γ -GT의 경우에는 대조군에 비교하여 2군(lovastatin, $p < 0.01$)에서 가장 높은 값을 보였고 4군(JBB-3 $p < 0.05$)과 5군(JBB-5, $p < 0.05$)의 경우에도 유의성 있게 증가되었으며, 3군(JBB-1), 6군(JBB-6) 및 7군(JBB-7)의 값도 유의성은 없었으나 대조군보다 높은 양상을 나타내었다. 그러나 8군(JBB-10)에서는 대조군보다 낮은 값을 나타내었다. 그 외 CK의 경우에는 각 군의 결과들간에 유의성 있는 변화를 찾을 수는 없었다.

2) 대동맥내 지방선의 분석

대동맥내 지방선을 ORO로 염색한 후 전체면적에 대한 지방선이 차지하는 면적(%)을 화상분석기를 이용하여 형태계측학적으로 비교 분석한 결과, 대조군과 비교하여 7개의 실험군으로 모두 유의성 있게 감소된 양상을 나타내어 시험물질 모두 혈관내 콜레스테롤 침착을 효과적으로 억제하는 것으로 판단되었다. 각 시험물질의 지방선 억제 정도는 lovastatin > JBB-7, JBB-10 > JBB-6 > JBB-1 > JBB-5 > JBB-3의 순이었다 (표 11, 그림 5-6).

3) 간조직내 지방함유 비정상 세포분석결과

고콜레스테롤 식이로 인한 간소엽내 과도한 지방함유로 세포배열이 불규칙하게되고 변형된 세포들의 비율을 1+부터 4+까지 구분하여 수치화하여 분석한 결과, 2군(lovastatin)의 간세포들이 대조군보다도 더 높은 비율로 나타나 가장 많은 손상을 받은 것으로 관찰되었으며, 6군(JBB-7, $p < 0.01$, 7군(JBB-7, $p < 0.05$) 및 8군(JBB-10, $p < 0.05$)의 경우에는 대조군에 비하여 유의하게 낮은 간세포의 손상율을 보였다. 그 외 시험물질들의 경우에도 유의하지는 않지만 대조군보다는 낮은 비율로 관찰되어

lovastatin을 제외한 모든 시험물질들이 간보호 효과가 있음을 암시하였다(표 11, 그림 7)

표 11. 고콜레스테롤 식이를 시행한 토끼에서의 flavonoids의 투여에 대한 지방선 및 간세포 변성도

Test Compounds	Fatty streak area in aorta(%) ^b	간세포의 변성정도 ^c
Control (n=5)	35.2±13.9	3.20±0.27
Lovastatin (n=5)	5.1±3.5* (P=0.008)	3.38±0.48 (P=0.255)
JBB-1 (n=6)	12.3±9.4* (P=0.017)	2.83±0.41 (P=0.061)
JBB-3 (n=6)	14.0±10.3* (P=0.024)	2.83±0.41 (P=0.060)
JBB-5 (n=6)	13.8±2.4* (P=0.048)	3.08±0.38 (P=0.289)
JBB-6 (n=6)	12.3±6.6* (P=0.012)	2.67±0.26* (P=0.004)
JBB-7 (n=6)	8.3±3.4* (P=0.001)	2.75±0.42* (P=0.035)
JBB-10 (n=6)	10.4±5.4* (P=0.008)	2.75±0.27* (P=0.012)

a: 모든 측정 값은 Mean ± SD로 나타내었음.

b: 흉부대동맥 일정부분의 전체면적에 대한 지방선이 차지하는 비율을 ‘%’로 나타낸 것임.

c: 간소엽내 비정상적으로 지방을 함유하고 있는 간세포의 비율을 1+ (0~25%), 2+ (26~50%), 3+ (51~75%), 4+ (76~100%)을 수치화한 것임.

*: 대조군과 비교하여 p<0.01 또는 p<0.05 (student t-test) 수준에서 유의성 차이가 있는 것을 나타냄.

4) 기타 장기의 조직학적 관찰결과

각 실험군의 폐, 심근, 신장, 근육 등의 조직을 광학현미경으로 관찰한 바, lovastatin군의 일부에서 신장의 신염 및 낭포형성을 관찰할 수 있었으나, 그 외 실험군에서는 특이한 병변을 관찰할 수 없어, 본 실험에서 이용된 시험물질들의 근육이나 장기에 대한 뚜렷한 독성이 있다는 증거는 발견하지 못하였다.

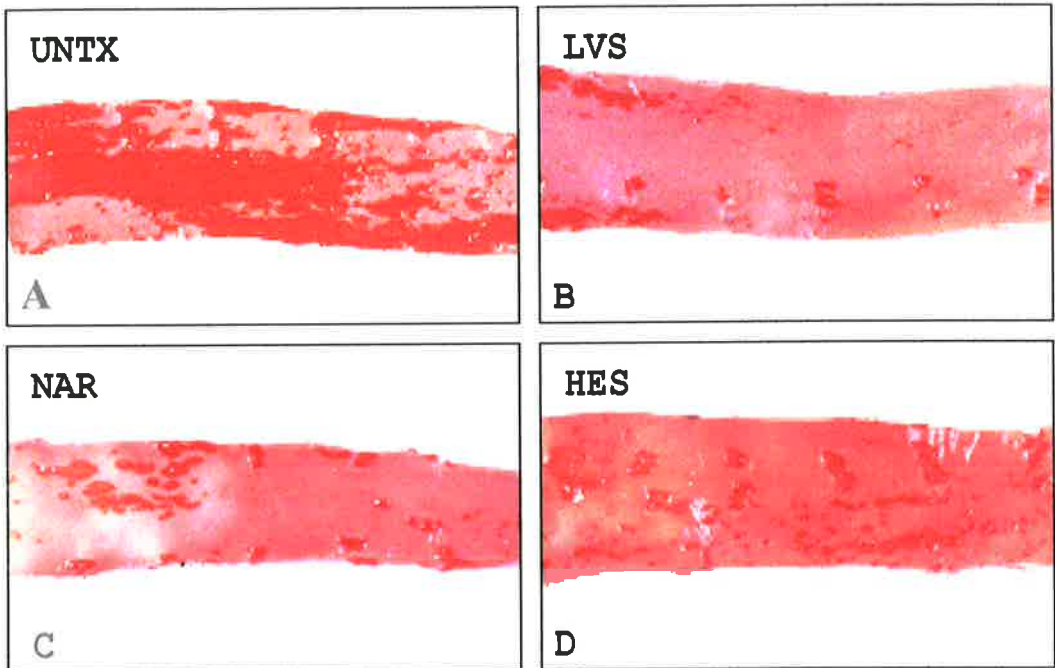


Fig. 5. Decreased fatty streak of aorta on rabbit by naringin or hesperidin with 1% cholesterol diet. A: untreated control; B: lovastatin treated; C: naringin treated; D: hesperidin treated.

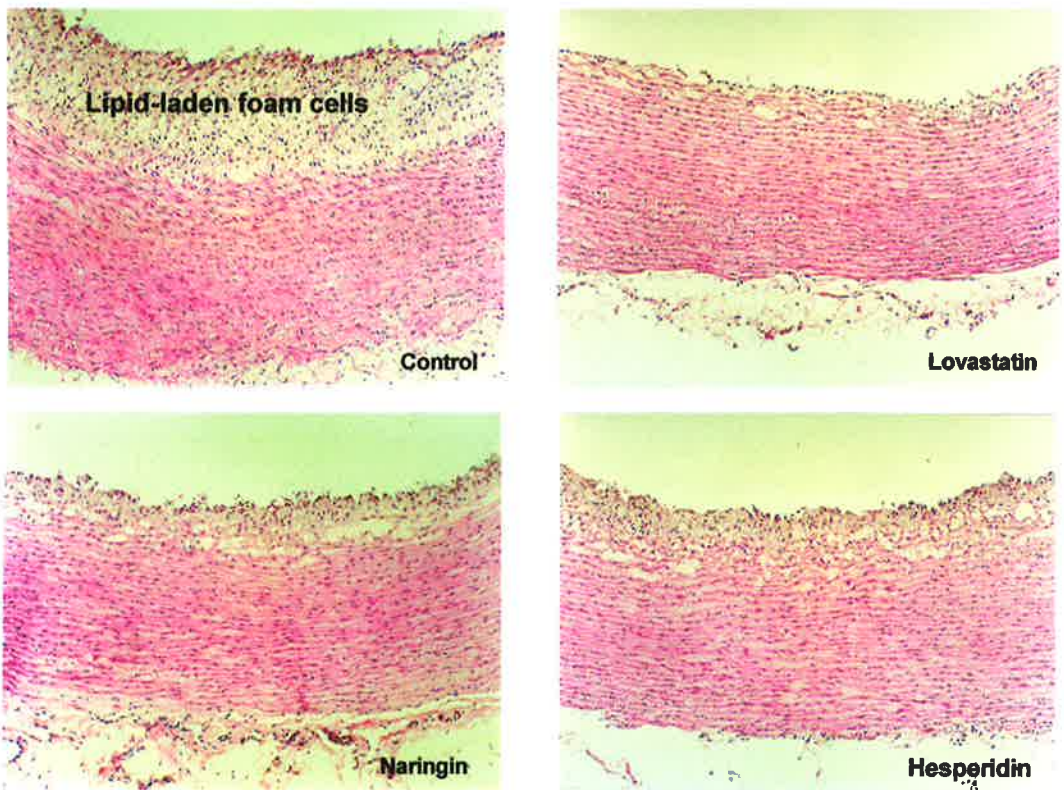


Fig. 6. Transverse section of aorta of 1% cholesterol-fed rabbits (X100).

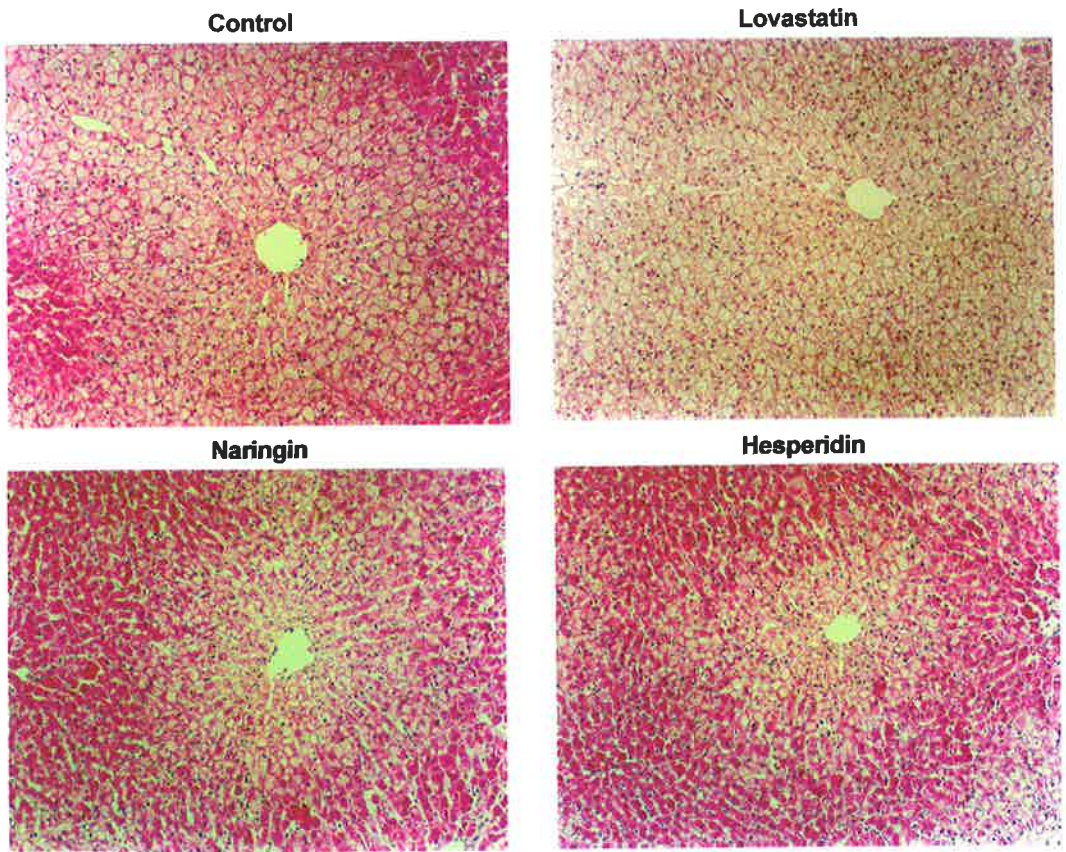


Fig. 7. Liver section of 1% cholesterol-fed rabbits (X100).

나. 2차 실험: JBB series의 토끼 항동맥경화 효과 실험

1) 실험동물 및 실험군

체중 2.8~3.0 kg의 3개월령 전후의 수컷 New Zealand White, 연암원예축산대학에서 공급받았으며, 실험군으로는 1차실험에 사용했던 것과 동일한 1% cholesterol 고형사료 (RC4 diet, Oriental Co., Japan)만을 섭취시키는 대조군 1개군 Naringin 또는 Hesperidin의 metabolite 유도체인 JBB-7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 및 lovastatin을 일정비율로 혼합하여 투여하면서 8주간 실험하였다(Table 2).

Table 12. Experimental design for rabbits fed the JBB series and high cholesterol diets (8 weeks).

Groups (n=6)	Diet supplementations
1 (Control)	1% cholesterol diet
2 (Lovastatin)	1% cholesterol + Lovastatin (1mg/kg) diet
3 (JBB-7)	1% cholesterol + JBB- 7 (0.1%, wt/wt) diet
4 (JBB-8)	1% cholesterol + JBB- 8 (0.1%, wt/wt) diet
5 (JBB-10)	1% cholesterol + JBB-10 (0.1%, wt/wt) diet
6 (JBB-11)	1% cholesterol + JBB-11 (0.1%, wt/wt) diet
7 (JBB-12)	1% cholesterol + JBB-12 (0.1%, wt/wt) diet
8 (JBB-13)	1% cholesterol + JBB-13 (0.1%, wt/wt) diet
9 (JBB-14)	1% cholesterol + JBB-14 (0.1%, wt/wt) diet
10 (JBB-15)	1% cholesterol + JBB-15 (0.1%, wt/wt) diet

2) 혈액화학분석 결과

혈중내 total cholesterol (TC)의 경우 전반적으로 매우 높은 값을 보여 의미분석에 어려움이 있으나 JBB-11, 12, 13 및 14 투여군에서 약간 낮은 값을 보였다. 총콜레스테롤치가 상대적으로 너무 높은 상태에서 HDL과 Triglyceride (TG) 절대값의 실험군 간 비교는 의미가 없는 것으로 판단된다.

총콜레스테롤중에서 HDL과 TG가 차지하는 비율을 비교한 결과, HDL의 경우에는 lovastatin JBB-11, 12, 13, 14 및 15 투여군에서 높게 나타났으며, TG의 비율은 JBB-8, 10 및 12 투여군의 값이 낮은 수치를 보였다.

간세포의 기능손상과 관련된 GOT와 GPT의 경우에도 개체간의 측정값 변이가 너무 심해 비교하기가 곤란한 것으로 판단된다. 그러나 JBB-10과 11 투여군의 경우 GOT,

GPT 양쪽 모두 낮은 값을 보여 간에 대한 독성이 없고, 간보호 효과가 어느 정도 있는 것으로 생각되었다.

심근이나 근육의 독성에 대한 지표로 이용되는 creatin kinase (CK)의 경우 의미있는 차이를 관찰할 수 없었다.

이상의 혈액화학분석 결과를 종합한 결과 **JBB-12** 투여군의 분석결과가 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 13. Effects of supplementation of JBB-series in plasma lipid concentration in rabbits fed 1% high cholesterol diets.

Groups	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TG (mg/dl)	GOT (IU/ℓ)	GPT (IU/ℓ)	CK (U/ℓ)
1 (Control)	1929 ±409	86±26	108±42	77±8	65±9	4465 ±2276
2 (Lovastatin)	1446 ±7866	58±23	153±95	43±12	81±44	3603 ±740
3 (JBB-7)	1517 ±417	57±28	167±43	59±45	74±49	6140 ±2238
4 (JBB-8)	1921 ±652	75±4	183±76	99±49	40±27	4788 ±2470
5 (JBB-10)	1559 ±347	53±13	139±46	32±42	74±61	4360 ±1792
6 (JBB-11)	1270 ±570	63±39	127±57	48±3	38±29	5656 ±3327
7 (JBB-12)	1257 ±150	80±23	108±22	55±20	90±83	4887 ±755
8 (JBB-13)	1183 ±605	63±41	139±68	49±41	103±35	4814 ±1947
9 (JBB-14)	1366 ±591	66±18	140±61	62±42	83±22	5892 ±2015
10 (JBB-15)	1468 ±755	85±40	174±130	28±36	32±42	3638 ±2457

3) 대동맥내 지방선의 분석결과

각 시험물질의 지방선 형성 억제정도는 JBB-8 >lovastatin > JBB-12 > JBB-10 > JBB-7 > JBB-11 > JBB-14 > JBB-13 > JBB-15 순이었으며, **JBB-8** 및 **JBB-12** 투여군의 지방선 억제효과가 매우 뛰어난 것이 주목된다. 또한 JBB-8의 경우에는 lovastatin 투여군의 지방선 비율과 같은 정도로 지방선 억제효과가 있는 것으로 나

타내 상당히 좋은 동맥경화 예방 효과를 보이고 있다. JBB-15의 경우에는 지방선 비율이 40% 이상으로 항동맥경화 효과는 거의 없는 것으로 보여지며 이를 제외한 나머지 8종류의 JBB series는 비교적 전반적으로 항동맥경화 효과가 있는 것으로 판단된다 (Table 14).

표 14. 고콜레스테롤 식이를 시행한 토끼에서의 JBB-series의 투여에 대한 지방선 및 간세포 변성도

Groups	Fatty Streak (%) ^d	간세포의 변성도 ^e
1 (Control)	47.4±12.3	3.20±0.27
2 (Lovastatin)	14.9±2.5	3.30±0.27
3 (JBB-7)	23.7±10.7	3.13±0.29
4 (JBB-8)	13.4±5.0	3.03±0.23
5 (JBB-10)	20.5±1.9	2.90±0.26
6 (JBB-11)	27.0±4.1	2.90±0.36
7 (JBB-12)	16.3±0.3	3.10±0.24
8 (JBB-13)	27.3±5.8	3.03±0.33
9 (JBB-14)	27.0 ±3.1	2.72±0.65
10 (JBB-15)	41.0±17.0	3.10±0.15

a: 모든 측정값은 Mean ± SD로 나타내었다.

b: 흉부대동맥 일정부분의 전체면적에 대한 지방선이 차지하는 비율을 '%'로 나타낸 것임.

c: 간소엽내 비정상적으로 지방을 함유하고 있는 간세포의 비율을 1+ (0~25%), 2+ (26~50%), 3+ (51~75%), 4+ (76~100%)을 수치화한 것임.

4) 간조직의 형태계측 결과

고콜레스테롤 식이로 인한 간소엽내 비정상적으로 과도하게 지방을 함유하거나 배열이 불규칙하게 변형된 세포들의 비율을 1+부터 4+까지 구분하여 수치화하여 분석한 결과, lovastatin 투여군이 가장 높은 값을 보여 간조직의 손상도가 큰 것으로 관찰된 반면, JBB-10, JBB-11 및 JBB-14가 낮은 값으로 관찰되어 간보호 효과가 있음을 암시하였다(table 14).

5) 조직학적 관찰결과

각 실험군 토끼의 폐, 심근, 신장, 근육 등의 조직에 대한 병리조직학적인 변화를 광학현미경으로 관찰한 바, 특이한 병변을 관찰할 수 없어, 본 실험에서 이용된 시험 물질들의 근육이나 장기에 대한 뚜렷한 독성이 있다는 증거는 발견하지 못하였다.

6) Liver microsomal ACAT 활성화도 측정

간 조직내의 ACAT assay를 위하여 효소원으로 microsome을 Frank H. 등(1973)이 실시한 분리 방법을 약간 변형 수정하여 분리하였으며, Erickson 등과 Gillies 등 (1986)의 방법을 수정, 보완하여 ACAT 활성을 측정하였다. 활성화도의 계산은 1 mg의 microsomal protein이 1 분간 생성하는 Cholesteryl Oleoate의 pmole수(pmoles Cholesteryl Oleoate formed/min/mg microsomal protein)로 나타낸다.

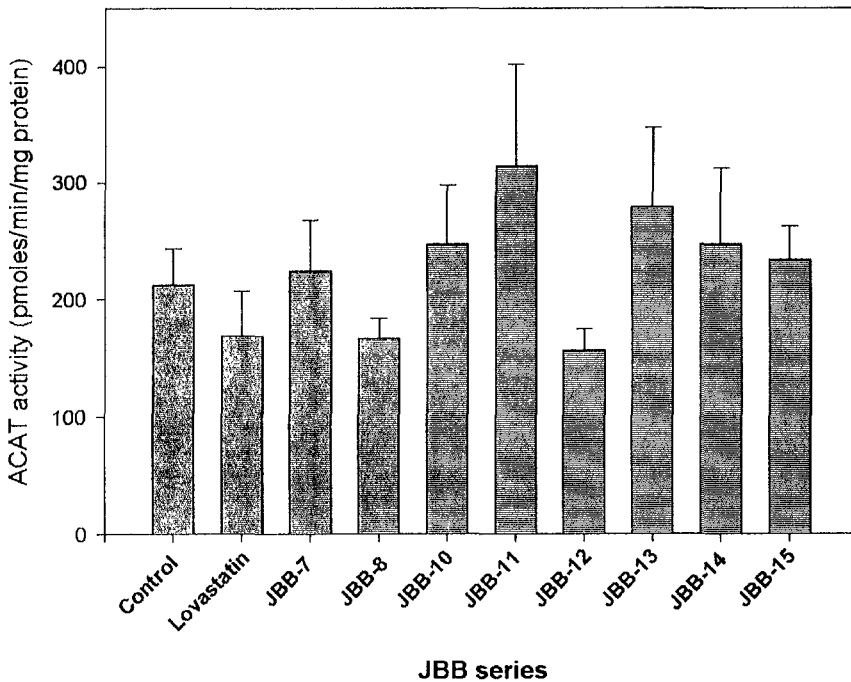


Fig. 8. Effects of supplementation of JBB-series in hepatic microsomal ACAT activities in rabbits fed 1% high cholesterol diets.

대조군 및 Lovastatin 투여군과 비교하여 JBB-7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 투여군에 대한 Liver microsomal ACAT 활성도를 측정한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. Lovastatin 투여군은 대조군에 비해 ACAT 활성이 20.6% 감소하였다. JBB-8과 Jbb-12는 각각 21.4%, 26.3% 씩 감소하여 Lovastatin 투여군과 비슷한 정도의 ACAT 활성 감소 효과를 나타내었다. 따라서 이 결과로부터 Naringin metabolite인 Jbb-8 또는 JBB-12가 free cholesterol의 저장성 변환 형태인 cholesteryl ester로의 전환을 억제하는 것으로 보이며, 유전자 발현 단계의 억제 효과로 인한 ACAT 효소 생산이 감소한 것인가의 여부는 지속적인 연구를 통해 규명해야 할 것이다.

4. 쥐를 이용한 flavonoids 투여에 따른 고지혈증 예방 효과 점정

1) 실험동물

체중 110~130 g 정도의 4 주령 Sprague-Dawley (SD) 수컷 랫트를 대한실험동물센터로부터 분양받아 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 및 12 시간의 명/암 주기로 조절되는 사육환경하에서 사육하면서 실험을 수행하였다. 실험군은 vitamin free casein (21%), sucrose (15%), solka floc (3%), vitamin mix (2%), mineral mix (5%), D,L-methionine (0.15%), sodium cholate (0.5%), dextrin (32.15%), lard (20%) 및 choline chloride (0.2%) 등에 1% cholesterol이 함유되어 있는 실험용 분말사료 (Test diets 5799M-B, PMI, USA)를 섭취시키는 대조군 1개군과 시험물질들을 일정비율로 혼합하여 섭취시키는 3개군의 실험군을 포함하여 총 4개군으로 나누어 총 6주 동안 투여하였다. 실험전기간에 걸쳐 사료와 물은 자유롭게 충분히 섭취할 수 있도록 하였다. 각 실험군의 사료조성과 실험내용은 Table 15에 나타내었다.

Table 15. Experimental design for rats fed the JBB series and high cholesterol diets (6 weeks).

Groups	No. of rats	Diets supplementations
1	8	1% cholesterol diet only (control)
2	9	1% cholesterol + JBB-5 (0.1%, wt/wt) diet
3	9	1% cholesterol + JBB-6 (0.05%, wt/wt) diet
4	8	1% cholesterol + JBB-10 (0.1%, wt/wt) diet

2) 혈액화학 분석

실험종료 후 diethyl ether로 흡입마취하여 심장으로부터 혈액을 채취하여 2시간 정도 정치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층부의 혈청을 분리하여 초저온냉동고에 보관하였다가 혈액분석에 사용하였다. 혈액분석은 glutamate-oxalate-transferase (GOT), glutamate-pyruvate-transferase (GPT), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) 및 creatin kinase (CK) 측정용 시약들 (Chiron Diagnostics Co., USA)을 사용하여 각 실험군의 혈청으로부터 혈액화학분석기 (CIBA Corning 550 Express, USA)로 직접 측정하였다. 또한 high density lipoprotein (HDL)을 분석하기 위하여 각 실험군의 혈청에 dextran sulfate와 magnesium sulfate를 넣어 LDL과 VLDL을 침전시킨 다음 상청액내의 HDL을 측정하는 방법 등^{1~3)}을 응용하여 만든 HDL 측정용 시약 (Chiron Diagnostics Co., USA)을 혈청과 1:10의 비율로 혼합한 다음 20~25℃ 정도의 incubator에서 5분간 반응하고 원심분리기로 2,500 rpm에서 10분간 원심하여 얻어진 상청액을 혈액화학분석기로 옮겨 측정하였다.

각 실험군 랫트의 혈청내 성분을 분석한 결과, HDL은 대조군에 비하여 JBB-5 ($p<0.01$), JBB-6 ($p<0.01$) 및 JBB-10 식이군 ($p<0.05$)에서 모두 유의성 있게 증가된 양상을 보였다. 총콜레스테롤 대비 HDL의 농도는 대조군에 비하여 JBB-5 및 JBB-6 식이군이 약 10%, JBB-10 식이군이 약 5% 정도 더 높은 증가율을 보여 혈액내 지질성분의 개선효과가 있음을 암시하였다. 총콜레스테롤 (TC)과 중성지질 (TG)의 경우에는 대조군에 비하여 JBB-6 ($p<0.01$)과 JBB-10 식이군($p<0.01$)에서 현저하게 감소되어 유의성 있는 변화를 나타내었다. **혈청 총 콜레스테롤을 JBB-5이 17%, JBB-6이 50%, JBB-10이 46% 감소시키는 좋은 결과를 얻었다** (Table 16). 또한 간손상과 관련있는 GOT의 경우에는 각 실험군간의 유의성 차이는 발견할 수 없었으나 JBB-5와 JBB-6 식이군에서 다소 낮은 값으로 JBB-10 식이군에서는 약간 높은 값으로 나타났다. 아울러 GPT의 경우에는 대조군 보다 JBB-5 ($p<0.05$) 식이군에서는 유의성 있게 감소된 결과를 보여주었으며, JBB-6과 JBB-10 식이군은 유의성 있는 변화는 아니지만 대조군 보다 낮은 값을 나타내어 간조직에 대한 특별한 독성은 없는 것으로 생각되었다. 그 외 CK의 경우에는 모든 실험군에서 유의성 있는 변화를 관찰하지 못하였다 (Table 17).

3) 조직학적 관찰

랫트의 각 장기와 조직에 대한 영향을 조사하기 위하여 대동맥, 심장, 폐, 간, 신장 및 근육 등을 절취하여 특이소견의 유무를 확인한 다음 10% 중성 포르말린에 넣어 24시간 이상 고정시킨 후, 흐르는 물로 충분히 수세하고 70%, 80%, 90% 및 100% 알콜로 단계적으로 탈수시킨 다음 paraffin 투과과정을 거쳐 포매기 (SHANDON, Histocentre 2, USA)를 이용하여 포매하였다. 포매된 조직은 박절편기 (LEICA, RM2045, Germany)로 약 4 μ m의 두께로 조직절편을 제작하여 H & E (Hematoxylin & eosin) 염색을 하고 xylene으로 투명화 과정을 거쳐 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰한 결과, 병변을 관찰할 수 없어, 본 실험에서 이용된 시험물질들의 근육이나 장기에 대한 뚜렷한 독성이 있다는 증거는 발견하지 못하였다.

Table 16. Results of serum analysis-I in the JBB series-fed rats.

Groups	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)
Control (n=8)	70.0 \pm 18.5	689.6 \pm 160.3	295.4 \pm 112.1
JBB-5 (n=9)	131.4 \pm 59.3 ^a (P=0.0077)	502.5 \pm 281.9 (P=0.0940)	338.4 \pm 251.4 (P=0.3536)
JBB-6 (n=9)	179.5 \pm 90.4 ^a (P=0.0030)	336.2 \pm 84.6 ^a (P=0.0000)	138.7 \pm 47.8 ^a (P=0.0007)
JBB-10 (n=8)	215.6 \pm 111.1 ^a (P=0.0138)	373.3 \pm 84.2 ^a (P=0.0014)	130.6 \pm 22.6 ^a (P=0.0137)

*: Mean \pm SD.

a: Means are significantly different ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) from control group.

Table 17. Results of serum analysis-II in the JBB series-fed rats.

Groups	GOT (IU/ ℓ)	GPT (IU/ ℓ)	γ -GT	CK (U/ ℓ)
Control (n=8)	146.1 ± 48.0	78.2 ± 21.5	2.97 ± 1.67	693.5 ± 426.6
JBB-5 (n=9)	129.2 ± 19.7 (P=0.2217)	54.1 ± 20.1 ^a (P=0.0307)	3.94 ± 2.99 (P=0.2420)	514.0 ± 97.4 (P=0.2203)
JBB-6 (n=9)	131.7 ± 19.1 (P=0.1069)	69.3 ± 16.0 (P=0.2641)	7.15 ± 5.21 (P=0.3324)	512.9 ± 488.2 (P=0.2482)
JBB-10 (n=8)	160.2 ± 40.4 (P=0.4085)	69.2 ± 10.7 (P=0.1036)	6.78 ± 4.05 (P=0.0658)	1127.5 ± 326.2 (P=0.1642)

*: Mean ± SD.

a: Means are significantly different ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) from control group.

5. 진피추출액의 고혈압쥐에 대한 혈압 및 심박수 측정

1) 고혈압쥐의 혈압 및 심박수에 대한 진피 ethanol extract의 작용

진피 ethanol extract를 비마취 DOCA/salt 고혈압쥐에 경구투여시 (10, 30 ml/kg) 각 용량에서 투여 후 약 30 분경부터 2 시간까지 혈압상승작용을 나타내었으며, 이후 24 시간 후까지는 혈압강하 작용을 나타내어 혈압에 대한 dual 작용을 보였으며 이 작용은 용량 의존적이었다 (table 18). 각 용량에서의 최대 혈압 상승 및 혈압강하율은 5 mg에서 각각 17.7%, -15.6% 이었고, 투여 후 6 시간까지 혈압상승작용을 보였으며 최대 효과는 25% 이었고, 심박수에는 영향을 미치지 않았다. RHR에 투여시 (10, 30 ml/kg) 혈압상승작용은 미약하였으며, 고용량에서 투여 후 4-24 시간까지 심박동수 증가현상을 수반하는 혈압강하작용을 나타내었으며 최대 혈압강하율은 -30.7%이었다 (Table 20).

2) 고혈압쥐의 혈압 및 심박수에 대한 hesperidin의 작용

Hesperidin을 비마취 DOCA/salt 고혈압쥐에 경구투여시 (1, 3g/kg) 투여 후 약 20 분에서 30 분경부터 용량 의존적인 혈압강하작용을 나타내어 이후 24 시간 후까지 지속되었다 (Table 21). 각 용량에서의 최대 혈압강하율은 각각 -21% 및 -31%이었고,

약간의 심박수 감소를 보였다. SHR에 투여시 (3 g/kg) 투여 후 1 시간 이후 약간의 혈압강하를 보였으며 (최대혈압 강하율: -9%), 심박수에 대한 작용은 없었다 (Table 22). RHR에 투여시 (1, 3 kg) 1 g 투여 후 20-30 분경부터 혈압이 감소하여 24 시간 까지 지속되었으나 (최대 혈압강하율: -30.6%) 3 g 투여시에는 혈압감소율이 미약하여 용량의존성을 보이지 않았다 (Table 23). 심박수에 대한 작용은 없었다.

3) 고찰 및 결론

진피 Ethanol extract의 경우 사용된 3 종의 고혈압 쥐에서 혈압상승에 연이은 혈압강하작용의 이중효과를 보였으며, 비마취 DOCA/salt 고혈압쥐에서 가장 큰 potency 및 두드러진 경향이 관찰되었다. 대조물질인 Hesperidin의 경우도 DOCA/salt 고혈압 쥐에서 현저한 용량의존성의 지속적인 혈압강하작용을 보였으며 RHR에서도 혈압강하작용의 경향을 보였다. 이상의 결과로 보아 진피 Ethanol extract의 경우 이노작용에 의한 혈압강하작용이 기대되고 분별추출 및 단일물질분리에 의한 추가실험과 장기 투여 protocol에 의한 생리활성의 추가규명을 통해 고혈압 및 순환계 질환 치료 작용을 보다 명확하게 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

Table 18. Effects of ethanol extract of tangerine peel on mean arterial pressure and heart rate in DOCA rats.

Mean blood pressure

Time	Control		10 ml/kg		30 ml/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	0.30	0.76	17.70	3.54	30.90	7.91
20 min	-0.20	1.69	11.60	2.92	42.10	8.13
30 min	0.20	2.67	6.60	3.82	37.80	6.67
60 min	-3.10	1.53	0.00	6.61	26.70	3.54
90 min	-1.30	2.34	-3.50	8.05	18.70	2.91
2 h	-6.00	1.99	-8.70	3.83	13.20	2.51
4 h	-6.60	1.65	-15.60	6.49	2.70	2.75
6 h	-7.20	3.05	-11.60	5.96	-1.10	3.18
22 h	-3.20	2.72	-11.70	6.35	-31.40	6.32
24 h	-6.40	1.69	-11.50	3.80	-30.80	10.02
Base line (mmHg)	144.00	13.40	157.00	8.60	154.00	5.90

Heart rate

Time	Control		10 ml/kg		30 ml/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	0.00	1.86	5.60	1.44	29.00	4.54
20 min	2.00	3.55	7.30	0.79	31.20	8.09
30 min	2.80	4.47	8.10	1.52	31.10	8.12
60 min	-1.50	2.81	4.20	1.72	37.00	11.36
90 min	-2.80	2.81	4.60	3.66	42.50	11.32
2 h	-4.70	3.66	3.20	1.22	41.50	10.92
4 h	-1.80	2.08	-5.60	4.46	20.40	8.67
6 h	-5.00	0.71	-9.00	4.00	8.00	8.12
22 h	-11.90	3.78	-19.70	5.42	8.40	17.00
24 h	-12.00	6.19	-9.00	4.74	13.50	20.65
Base line (mmHg)	284.00	34.10	310.00	17.30	154.00	13.50

Table 19. Effects of ethanol extract of tangerine peel on mean arterial pressure and heart rate in SHR.

Mean blood pressure

Time	Control		30 ml/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	-0.20	3.52	19.10	3.72
20 min	-1.90	1.82	22.30	3.17
30 min	-3.20	1.75	24.90	4.19
60 min	-2.30	2.00	25.50	4.76
90 min	-3.00	0.86	19.80	3.67
2 h	-1.00	1.31	18.20	4.41
4 h	-0.60	3.06	15.90	4.49
6 h	-0.90	3.06	12.60	4.44
22 h			-2.00	2.04
24 h	-0.10	2.25	3.90	8.34
Base line (mmHg)	150.00	3.80	142.00	5.90

Heart rate

Time	Control		30 ml/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	8.40	1.83	10.00	1.99
20 min	7.10	1.35	20.10	2.31
30 min	2.50	1.70	25.80	6.46
60 min	-0.50	0.90	19.20	7.97
90 min	1.70	2.38	20.30	8.63
2 h	-0.80	1.60	30.30	8.81
4 h	-5.00	2.66	37.10	10.74
6 h	-7.50	2.72	31.60	12.79
22 h			6.70	1.96
24 h	-10.10	2.05	15.80	10.92
Base line (mmHg)	366.00	8.30	300.00	5.80

Table 20. Effects of ethanol extract of tangerine peel on mean arterial pressure and heart rate in RHR.

Mean blood pressure

Time	Control		10 ml/kg		30 ml/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	-2.20	0.97	10.60	3.93	2.10	2.09
20 min	-0.60	1.65	8.70	3.50	9.40	1.71
30 min	-0.30	1.22	9.20	2.11	13.10	1.09
60 min	-1.20	1.60	10.90	2.29	9.70	0.90
90 min	1.80	0.75	3.80	2.82	4.70	2.06
2 h	3.00	1.99	0.50	2.57	-0.90	2.42
4 h	-3.10	1.34	2.40	2.11	-24.50	8.79
6 h	-4.30	2.91	0.00	1.76	-30.70	7.27
22 h	-1.50	0.72	-7.70	3.23	-17.00	6.99
24 h	-0.20	1.01	-8.10	2.81	-19.10	6.60
Base line (mmHg)	182.00	3.00	163.00	9.20	185.00	9.20

Heart rate

Time	Control		10 ml/kg		30 ml/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	5.90	2.72	8.50	3.23	3.50	0.74
20 min	6.50	2.70	4.90	3.61	14.80	4.32
30 min	2.00	1.93	1.50	3.86	23.90	7.15
60 min	-0.10	2.79	0.90	4.20	34.10	12.34
90 min	0.10	2.90	0.90	3.22	37.70	13.33
2 h	5.80	4.06	0.80	3.03	40.00	14.25
4 h	5.10	1.67	0.70	6.49	42.00	14.39
6 h	-2.20	4.73	1.80	6.46	41.50	12.10
22 h	0.80	1.24	7.40	6.79	25.70	5.60
24 h	-5.80	2.19	9.80	6.67	16.30	8.92
Base line (mmHg)	393.00	17.00	342.00	10.20	370.00	30.30

Table 21. Effects of hesperidin on mean arterial pressure and heart rate in DOCA rats.

Mean blood pressure

Time	Control		1 g/kg		3 g/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	0.30	0.76	-2.00	1.52	-0.70	1.33
20 min	-0.20	1.69	-3.90	1.95	-3.30	2.87
30 min	0.20	2.67	-3.60	3.13	-7.30	2.75
60 min	-3.10	1.53	-6.50	3.30	-13.30	3.90
90 min	-1.30	2.34	-14.10	4.88	-17.80	3.62
2 h	-6.00	1.99	-17.20	3.48	-17.40	3.80
4 h	-6.60	1.65	-17.30	1.28	-20.00	4.83
6 h	-7.20	3.05	-16.50	5.73	-27.60	1.79
22 h	-3.20	2.72	-17.20	6.63	-25.00	2.97
24 h	-6.40	1.69	-21.00	5.36	-31.00	1.61
Base line (mmHg)	144.00	13.40	161.00	6.40	158.00	5.10

Heart rate

Time	Control		1 g/kg		3 g/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	0.00	1.86	6.90	2.45	4.10	2.56
20 min	2.00	3.55	4.80	1.39	3.40	2.07
30 min	2.80	4.47	3.40	1.03	3.20	1.71
60 min	-1.50	2.81	1.90	2.26	-3.10	3.13
90 min	-2.80	2.81	-2.80	3.51	-3.10	3.13
2 h	-4.70	3.66	-4.80	3.97	-2.30	2.73
4 h	-1.80	2.08	2.30	3.25	-4.20	0.85
6 h	-5.00	0.71	-8.00	3.28	-14.40	4.82
22 h	-11.90	3.78	-20.60	2.68	-24.30	4.84
24 h	-12.00	6.19	-18.90	1.93	-21.40	2.91
Base line (mmHg)	284.00	34.10	296.00	11.20	313.00	17.60

Table 22. Effects of hesperidin on mean arterial pressure and heart rate in SHR.

Mean blood pressure

Time	Control		3 g/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	-0.20	3.52	3.70	1.94
20 min	-1.90	1.82	2.10	3.34
30 min	-3.20	1.75	3.00	3.46
60 min	-2.30	2.00	-1.20	2.25
90 min	-3.00	0.86	-4.20	1.56
2 h	-1.00	1.31	-2.30	3.42
4 h	-0.60	3.06	-7.20	3.17
6 h	-0.90	3.06	-6.60	4.11
22 h			-9.00	3.33
24 h	-0.10	2.25	-7.20	4.91
Base line (mmHg)	150.00	3.80	143.00	3.70

Heart rate

Time	Control		3 g/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	8.40	1.83	5.10	3.11
20 min	7.10	1.35	1.70	2.12
30 min	2.50	1.70	4.40	2.93
60 min	-0.50	0.90	0.30	3.97
90 min	1.70	2.38	-1.30	3.32
2 h	-0.80	1.60	-0.50	2.83
4 h	-5.00	2.66	-0.10	1.32
6 h	-7.50	2.72	-1.50	1.52
22 h			-9.40	3.13
24 h	-10.10	2.05	-5.80	3.51
Base line (mmHg)	366.00	8.30	308.00	13.10

Table 23. Effects of hesperidin on mean arterial pressure and heart rate in RHR.

Mean blood pressure

Time	Control		1 g/kg		3 g/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	-2.20	0.97	-4.50	2.93	-2.50	1.62
20 min	-0.60	1.65	-7.70	3.06	-2.50	1.63
30 min	-0.30	1.22	-7.60	2.93	-0.30	2.20
60 min	-1.20	1.60	-7.70	3.13	3.20	2.29
90 min	1.80	0.75	-8.80	3.16	-0.30	1.84
2 h	3.00	1.99	-9.90	3.36	-0.60	2.17
4 h	-3.10	1.34	-9.60	3.19	-3.50	1.84
6 h	-4.30	2.91	-11.70	3.79	-5.20	1.46
22 h	-1.50	0.72	-28.80	6.28	-7.70	2.74
24 h	-0.20	1.01	-30.60	4.86	-11.00	2.50
Base line (mmHg)	182.00	3.00	187.00	6.10	169.00	10.50

Heart rate

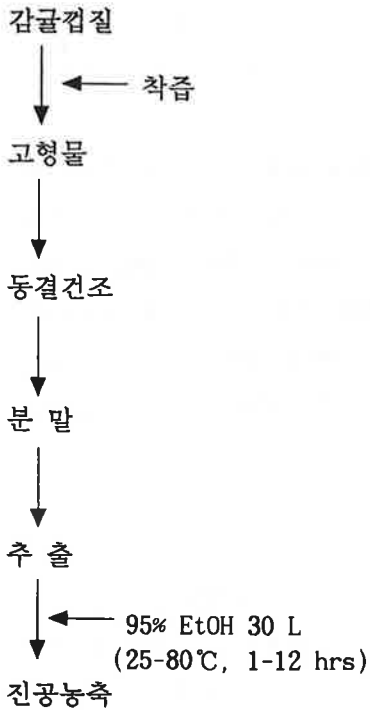
Time	Control		1 g/kg		3 g/kg	
	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.	Mean (%)	S.E.M.
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10 min	5.90	2.72	3.80	2.97	-4.30	1.99
20 min	6.50	2.70	3.80	2.97	-5.20	2.73
30 min	2.00	1.93	2.30	1.48	-4.70	2.40
60 min	-0.10	2.79	1.50	0.85	2.10	4.37
90 min	0.10	2.90	5.00	3.30	1.30	3.70
2 h	5.80	4.06	8.40	2.38	3.60	4.85
4 h	5.10	1.67	12.10	5.44	-4.70	3.04
6 h	-2.20	4.73	4.60	2.37	-5.40	2.33
22 h	0.80	1.24	8.10	2.18	1.40	2.36
24 h	-5.80	2.19	6.00	1.60	-0.40	3.67
Base line (mmHg)	393.00	17.00	373.00	22.90	360.00	19.10

6. Pilot plant 가동

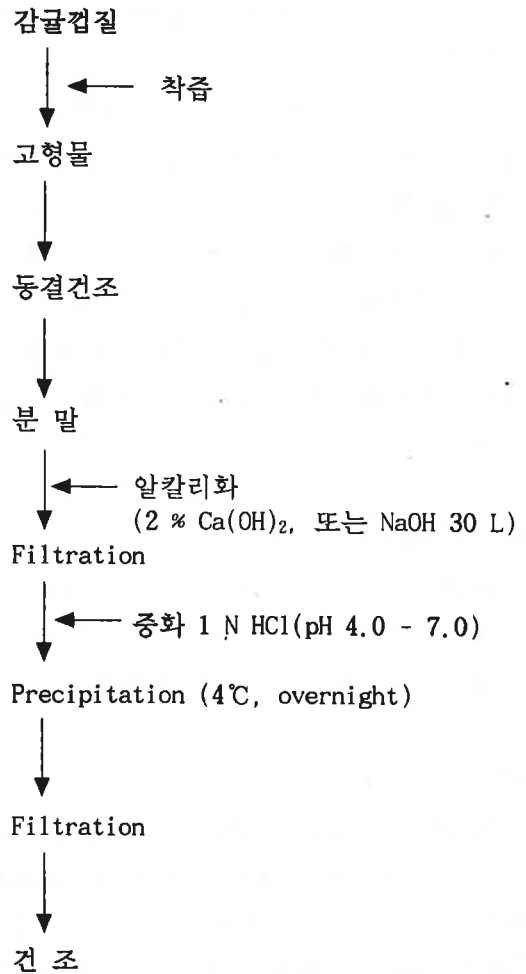
Pilot plant 가동을 위한 생산 공정 개발, 생명공학연구소 생물시험공장(Pilot Plant)을 이용한 굴피의 대량 추출 시도, 생산전략, 공장입지, 설비 및 기자재를 검토하여 대량생산 체제를 위한 준비 단계 연구를 수행하였다.

가. JBB-1 생산공정

생산공정 1



생산공정 2



기능성 건강개선제 JBB-1의 생산공정은 감귤껍질을 수거하여 착즙을 통한 고형물을 만들고 이를 동결건조하여 분말화한다. 여기에서 알칼리화(2% Ca(OH)₂, or NaOH 30 L) 과정을 거치며 Filtration 이후 중화 1N HCl(pH 4.0 - 7.0) 과정을 거쳐 Precipitation(4°C, overnight)과 Filtration을 거쳐 건조의 과정을 거치면 원료물질은 완성이 된다. 원료물질이 완성되면 캡슐화 과정을 거쳐 포장만 하면 최종 판매제품이 완성된다.

나. 생명공학연구소 생물시험공장(Pilot Plant)을 이용한 귤피의 대량 추출

① 귤피(건조 중량) 6 kg에 30% ethanol 60 L(ethanol 18 L : H₂O 42 L)를 첨가하고 추출의 효율을 높이기 위하여 50°C - 60°C로 온도로 조정된 추출기를 이용하여 24시간 추출하였다. 상층의 추출액만을 모아서 진공 증발 농축기를 이용하여 3.8 L로 농축하였다. 이때의 수분 함량은 65.4%이었으며, 이것을 다시 동결건조기를 이용하여 건조 중량 1.315 kg을 건조분말을 얻었다.

② 감귤껍질을 착즙한 후, 고형물을 동결건조시킨 귤피분말 5.8 kg에 0.3% NaOH 용액 70 L를 첨가하였다. 4시간 동안 반응시키면서 추출하고 20 mesh filter를 통과하여 펄프를 제거하고, 여기에 다시 30 L 물을 첨가하여 60 mesh, 연이어 140 mesh로 걸른 후 여액에 1 N HCl을 첨가하여 pH 4.0-7.0으로 조절하였다. 4°C cold room에서 12 가량 방치하여 충분히 침전물이 생성되도록 한 후, 연속원심분리기(Bioplant, CEPA)를 이용하여 침전물을 분리하였다. 이 침전물을 동결건조하여 400 g의 분말을 얻었다.

다. 생산전략

원료물질의 생산은 Outsourcing 개념에 입각하여 자체생산보다는 원료물질의 구입을 통하여 해결하고자 한다. 이미 제주시, 제주시 농협, 감귤협동조합과 협의를 통하여 이들 단체에서 원료물질을 자체생산하여 공급하는 협의가 이루어 졌다.

라. 공장입지

현재 본 벤처기업의 입주지를 몇군데 검토중인데 가장 타당한 입지조건을 갖추고 있는곳은 대전광역시 유성구 52번지에 소재하고 있는 생명공학연구소의 창업보육센터(TBI)를 이용하는 것으로 판단되고 있다. 본 창업보육센터는 중기청에서 금년도에 생명공학연구소에 설치하는 것을 적극 추진중에 있어 생명공학연구소의 기존 시설(생물시험공장 등) 활용도 측면에서 매우 유리한 위치를 차지할 수 있을 것으로 평가된다.

입주비용도 저렴할 뿐 아니라 생명공학연구소가 보유하고 있는 생물시험공장(Pilot Plant) 및 각종 실험기기를 저렴한 비용에 사용할 수 있고, 연구소가 보유하고 있는 박사급 연구인력을 손쉽게 활용할 수 있을 뿐만 아니라 기술정보실의 각종 연구정보를 손쉽게 활용할 수 있다.

마. 설비 및 필요기자재

Cost Estimation of Equipments

	2000년	2001년	2002년	2003년
판매예상액	30억원	89억원	214억원	295억원
판매가 (원/kg)	1,000,000	1,000,000	1,000,000	1,000,000
생산요구량 (톤/년)	3	9	21	30
생산요구량 (톤/년)	0.25	0.75	1.8	2.5
1. 생산요구량 (kg/주)	63	190	450	630
2. 건조굴껍질량(톤/주)	2.5	7.6	18	25
필요 Wet 굴껍질량(톤/주)	7.5	23	54	75
필요 Wet 굴껍질량(톤/주)	360	1,100	2,600	3,600

- 2 = 1 ÷ 5
- 추출 Yield : 50 mg/1 g 건조굴 껍질 = 50 kg/1 톤 건조굴 껍질
- 회수율 : 50%
- 총 추출 Yield : 25 kg/1 톤 건조굴껍질(50 kg/1 톤 x 0.5 = 25 kg/1 톤)
- 예상판매가 : \$ 1,000/kg = 1,200,000 원/kg

필요 기자재

(단위: 억원)

기기장비	2000년	2001년	2002년	합계
열풍건조기	5	15	5	25
동결건조기	4	10	15	29
분말파쇄기	2	6	3	11
추출기	10	30	10	50
농축기	5	15	5	25
Filtration	5	15	5	25
결정조	6	20	10	36
유동층건조기	8	15	10	33
포장기	10	20	10	40
합계	55	146	73	274

7. 산업체 기술 이전

생명공학연구소 바이오벤처센터내에 설립한 연구원창업회사인 (주) 비 알 아이는 (주) 바이오맥스와 기술실시 계약을 체결하였으며, 이에 그 계약서 사본을 첨부하였다.

계 약 서

(주)비알아이(이하 "갑"이라 칭한다)와 (주)바이오맥스 (이하 "을"이라 칭한다)는 아래 정의한 "Know-How" (이하 "기술"이라 한다)를 실시함에 있어 다음과 같이 계약을 체결한다.

제 1 조 (정의)

본 계약상의 "기술"이라 함은 JBB-1, JBB-2, JBB-3, JBB-4와 관련된 특허 및 이를 이용한 건강식품 및 의약품 생산기술을 의미한다. JBB-5 ~ JBB-15등 현재 연구되고 있는 기술들은 추후 상호 협의한다.

제 2 조 (실시권의 내용)

1) "갑"은 "을"이 본 계약의 조건에 따라 국내는 물론 전세계시장을 대상으로 "기술"(특허가 발생하는 경우 특허권 포함)을 실시하는데 동의한다.

2) 1)항의 실시권은 제1조에 정의한 "기술"을 이용하여 제품을 생산, 판매하는 권리를 말한다.

3) "을"이 기술실시권을 2년내에 행사하지 않을 경우 "갑"은 제3자에게 기술실시권을 허용할 수 있다.

제 3 조 (국외실시)

국외실시는 국내이외의 지역에 실시권을 하여하거나 기술을 수출하는 것을 말한다.

제 4 조 (실시기간)

본 계약기간은 "갑"과 "을" 쌍방이 계약체결을 한날로부터 특허기간이 존속되는 연도말에 만료되는 것으로 한다.

제 5 조 (실시대가)

"을"은 본기술의 실시권에 대한 대가로서 다음과같이 실시대가를 "갑"에게 지급한다.

1) "을"은 계약일로부터 12개월 이내에 사업추진비로 총10억원(1차 3억원, 2차 3억원, 3차 3.5억원)을 매4개월 간격으로 지급하며 계약금 5천만원을 지급한다.

"을"은 1항의 경비제공외에 추후 계속될 연구개발을 위한 충분한 제품개발비를 제공하기로 하며 자세한 내용은 추후 협의한다.

2) "을"은 경상실시료 계약체결후 계약만료일까지 매년 본 계약 제품과 관련 발생한 순매출액의 일정분을 제6조의 방법에 의해 "갑"에게 지급한다(단, 식품의 경우 3% 의약품의 경우 5% ~ 7%). 순매출액은 총매출액에서 매출에누리액, 환입품액과 제품판매에 따른 간접세, 보험료, 운반비, 판매수수료, 광고선전비를 공제한 것을 말한다.

제 6 조 (실시료 계산)

“을”는 제 5조 2)항 기술의 실시 대가를 다음과 같이 “갑”에게 지급한다.
“실시료”계산은 매년 1월 1일부터 12월 31일까지를 결산 기준으로 하여 당해 “실시료”를 익년도 3월말까지 “갑”에게 지급한다.

제 7 조 (상호출자)

“갑”과 “을”은 각각 전체지분에 대한 10%의 주식을 상호 교환 출자한다(단, 출자방법은 별도 협의 결정한다)

제 8 조 (기술의 개량)

“갑”이 제 1조에 의한 “기술”로써 특허권, 실용신안권 등을 취득, 소유하였을 때에는 “을”이 본 계약에 의해 우선적으로 동 특허권, 실용신안권등을 실시하는 것으로 본다

제 9 조 (신의성실의 의무)

본 계약이 목적하는 바를 상호 충족시키기에 필요한 제반사항에 대하여 “갑”은 제1조에 관한 사항을 적극적으로 “을”에게 제공 협조하여야 하며, 또한 “을”은 본 계약을 성실히 이행하도록 최선을 다하여야 한다.

제 10 조 (비밀보장)

“을”는 “기술”이 타에 제공되거나 누설되지 않도록 보안에 유의하여야 하며, 이 의무는 그 임원 및 피용자나 그 승계인을 통하여 사실상 위반됨이 없도록 하는 의무를 포함한다. 또한, 본 조항은 본 계약이 해제 또는 해지되었을 경우에도 계속 유효하다.

제 11 조 (계약의 변경)

본 계약의 내용은 “갑”과 “을”의 서면합의에 의하여 유효하게 변경될 수 있다.

제 12 조 (예외사항)

본 계약의 어느 일방도 본계약을 이행함에 있어, 천재지변 또는 불가항력으로 발생하거나 기타 일방의 고의, 과실 또는 태만에 의하지 아니한 경우로 인하여 발생한 여하한 성격의 손실 또는 손해에 대하여도 그 일방은 상대방에게 책임을 지지 아니한다.

제 13 조 (손해배상)

“갑”과 “을”은 상호 본 계약의 의무사항을 위반 또는 이행치 못하므로 인해 발생한 손해에 대해 상호 이를 배상하여야 한다.

제 14 조 (명칭사용)

“을”은 본 계약에 의거 지득한 정보 및 “갑”이 “을”에게 제공한 보고서 및 문서 또는 자료 전부에 대한 그 원본이나 복제, 복사물을 갑과 사전에 협의한후 광고, 판매촉진, 기타 선전의 목적으로 사용할 수 있다.

제 15 조(분쟁해결)

본 계약과 관련하여 혹은 쌍방의 의무이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우, "갑"과 "을"은 이를 상호협의하여 원만히 해결토록 노력하여야 한다.

제 16 조(계약의 효력)

본 계약의 효력은 쌍방이 서명 날인한 날로 부터 유효하다.

제 17 조(해석)

본 계약에 명시되지 아니하거나 본 계약상의 해석상 이의가 있는 사항에 대하여는 쌍방의 합의에 의해 결정한다. 본 계약서는 2통을 작성하여 서명날인하고 "갑"과 "을"이 각각 1통씩 보관한다.

제 18 조 (중요사항의 변경)

"갑"과 "을" 쌍방은 본 계약서 당시 사항과 다른 변경사항 또는 본 계약서 상의 내용과 관련된 사항이 변경되었을 때에는 지체없이 상대방 측에 통보하여야 한다.

2000 년 3 월 10 일

"갑"

주 소 : 대전시 유성구 어은동 52번지 생명공학연구소 바이오벤처센터
전 화 : (042) 860 - 4001

상 호 : (주) 비 알 아이 대표이사



김 덕 년

"을"

주 소 : 서울시 강남구 삼성동 164-14
전 화 : (02) 564 - 7080

상 호 : (주) 바이오맥스 대표이사

박 진 우

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

심혈관 질환 예방·치료에 활성을 보이는 생체활성물질을 함유하는 농작물, 특용작물, 약용작물, 산채, 과채류 등을 탐색하고 이들로부터 유용물질 성분들을 분리·정제하며 기능성 건강증진용 성분, 건강식품성분, 약용성분원료로 개발하여 농가소득증대, 농촌경제 활성화, 생약재 수입 대체 및 수출산업 창출에 기여하고자 하는 기본 취지하에, 농산자원으로부터 심혈관 질환 예방, 치료 활성 신소재 개발에 관한 연구를 수행하였다.

1. CETP 저해제 탐색 :

약리활성물질 스크리닝 방법으로 CETP 저해제 탐색방법을 확립하였다.

90여종의 식품재료, 농산물재료 등을 이용하여 콜레스테롤 전이단백질 저해활성 성분을 탐색하는데 성공하였다. 이 중 15개의 농작물 등은 콜레스테롤 전이단백질 저해활성을 보여주었다. CETP 저해활성을 나타내는 시료중에서 linoleic acid(CETP IC₅₀ value 29.3 μ M)나 linolenic acid(CETP IC₅₀ value 35.7 μ M)를 포함하는 의사 CETP 저해물질을 선별하여 배제하였다.

생강으로부터 용매추출, 실리카겔 column, HPLC를 이용하여 gingerol계의 물질인 [10]-Dehydrogingerdione과 [6]-Dehydrogingerdione을 분리하였으며, 콜레스테릴 에스테르 전이단백질(CETP) 저해활성의 측정을 측정한 결과, [10]-Dehydrogingerdione의 IC₅₀ 치는 35 μ M이고, [6]-Dehydrogingerdione의 IC₅₀ 치는 120 μ M이었다.

2. 감귤과피로부터 Flavonoids 대량 추출 방법의 확립 :

제주도산 감귤껍질을 그늘에서 건조하여 분말화한 시료를 30-90% ethanol 용액, NaOH 용액, Ca(OH)₂ 용액으로 추출하고, HPLC를 이용하여 함유하고 있는 Naringin과 Hesperidin의 함량을 조사한 결과, 알카리 처리 방법이 효율적인 방법이 될 수 있음을 알 수 있고, 고순도를 얻기 위해 Ca(OH)₂에 의한 침전물 생산 방법이 우수하여 대량생산에 응용될 수 있다.

제주도에서 구입한 재래 감귤인 산물, 스타치, 청귤, 병귤, 온주, 당유자, 하귤, 한라봉을 대상으로 위와 같은 방법으로 flavonoids를 추출하여 naringin과

hesperidin의 함량을 조사한 결과 수확기에 다른 naringin과 hesperidin의 함량에 큰 차이가 있는 것으로 나타났다.

3. 토끼를 이용한 flavonoids 투여에 따른 고지혈증 및 동맥경화 예방 및 치료 활성 검증 :

체중 2.5~2.6 kg의 3 개월령 뉴질랜드 백색종 (New Zealand White)의 건강한 수컷 토끼를 이용하여 1% 고콜레스테롤 식이와 함께 naringin, hesperidin 및 naringin metabolite를 병행 투여하여 심장순환기 질환의 예방 및 치료 효과를 관찰하고자 하였다. 혈액화학 분석을 통한 혈중 콜레스테롤 및 지방의 변화, 대동맥내 지방선의 관찰, 간조직내 지방 함유 비정상 세포를 분석한 결과, 총콜레스테롤은 JBB-6가 50%, JBB-10이 46% 감소된 좋은 결과를 얻었고, 지방성 침착은 대조군과 비교하여 전반적으로 유의성 있게 감소된 양상을 나타내어 시험물질 모두 혈관내 콜레스테롤 침착을 효과적(특히 JBB-8, JBB-12)으로 억제하는 것으로 판단되었고, JBB-7, 10, 11, 14의 경우에는 대조군에 비하여 유의하게 낮은 간세포의 손상율을 보여 간보호 효과가 있음을 암시하였다. JBB-8 및 JBB-12를 투여한 군의 liver microsomal ACAT 활성도가 20-25% 정도 감소하였다. 이로부터 naringin, hesperidin을 비롯하여 naringin metabolite들의 동맥경화 및 고지혈증 예방 및 치료 효과를 관찰하였다.

4. 진피추출액의 고혈압쥐에 대한 혈압 및 심박수 측정 :

진피 Ethanol extract의 경우 사용된 3 종의 고혈압 쥐에서 혈압상승에 연이은 혈압강화작용의 이중효과를 보였으며, 비마취 DOCA/salt 고혈압쥐에서 가장 큰 potency 및 두드러진 경향이 관찰되었다. 대조물질인 Hesperidin의 경우도 DOCA/salt 고혈압 쥐에서 현저한 용량의존성의 지속적인 혈압강화작용을 보였으며 RHR에서도 혈압강화작용의 경향을 보였다. 이상의 결과로 보아 진피 Ethanol extract의 경우 이노작용에 의한 혈압강화작용이 기대되고 분별추출 및 단일물질분리에 의한 추가실험과 장기 투여 protocol에 의한 생리활성의 추가규명을 통해 고혈압 및 순환계 질환 치료 작용을 보다 명확하게 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

5. 논문 발표 및 특허출원, 등록

가. 논문발표실적 (해외저널 6편, 국내저널 1편)

- 1) Bok, S. H., Lee, S. H., Park, Y. B., Bae, K. H., Son, K. H., Jeong, T. S. and Choi, M. S. (1999) "Plasma and Hepatic Cholesterol and Hepatic

Activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase and Acyl CoA:Cholesterol Transferase are Lower in Rats fed Citrus Peel Extract or a Mixture of Citrus Bioflavonoids, *Journal of Nutrition* Vol 129(6):1282-1185

- 2) Shin, Y. W., Bok, S. H., Jeong, T. S., Bae, K. H., Jeoung, N. H., Choi, M. S., and Park, Y. B. (1999) "Hypocholesterolemic Effect of Naringin Associated with Hepatic Cholesterol Regulating Enzyme Changes in Rats" *International Journal of Vitamin and Nutrition*, Vol. 69(4): 27-31
- 3) Lee, S. H., Jeong, T. S., Park, Y. B., Kwon, Y. K., Choi, M. S. and Bok, S. H. (1999) "Hypocholesterolemic Effect of hesperetin mediated by inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A:Cholesterol acyltransferase in rats fed high-cholesterol diet" *Nutrition Research* 19(8):1245-1258
- 4) Lee, S. H., Cho, K. H., Bae, K. H., Bok, S. H., Kwon, Y. K., Lee, E. S. and Choi, M. S. (1999) "Cholesterol-lowering activity of naringenin via inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase and acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in rats" *Annals of Nutrition & Metabolism* 43(3): 131-190
- 5) Bok, S. H., Shin, Y. W., Bae, K. H., Jeong, T. S., Kwon, Y. K., Park, Y. B. and Choi, M. S. (1999) "Effects of naringin and lovastatin on plasma and hepatic lipids in high-fat and high-cholesterol fed rats" Accepted to *Nutrition Research*.
- 6) Choi, S. C., Kim, H. S., Jeong, T. S., Bok, S. H., and Park, Y. B. : Antiatherogenic effect of naringin independent of lipid-lowering action in hypercholesterolemic rabbits. *Kor. Circ. J.* 28(11) : 1873-1881 (1998)
- 7) Jeong, T. S., Hwang, E. I., Lee, H. B., Lee, E. S., Kim, Y. K., Min, B. S., Baw, K. H., Bok, S. H., and Kim, S. U. : Chitin synthase II inhibitory activity of Ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnatifida*. *Planta Med.* 65 : 261-263 (1999)

나. 국제 및 국내 특허 실적

국제특허 출원: (10 건)

- 1) Bioflavonoids as HDL increasing agent. Korean Patent Appl. No. 98-43909, PCT/KR 98/00326, US patent appl. 1998. 10. 20.
- 2) Citrus peel extract as ACAT inhibitor, macrophage-lipid complex formation inhibitor, liver disease preventing agent, and blood sugar reducing agent, PCT(1998. 10. 20), PCT/KR 98/00322, U.S patent appl.
- 3) Naringin, naringenin as ACAT inhibitor, macrophage-lipid complex formation inhibitor, liver disease preventing agent, and blood sugar reducing agent, PCT(1998. 10. 20), PCT/KR 98/00323, U.S patent appl.
- 4) Hesperidin and hesperetin as ACAT inhibitor, macrophage-lipid complex formation inhibitor, liver disease preventing agent, and blood sugar reducing agent, PCT(1998. 10. 20), PCT/KR98/00324, U.S patent appl.
- 5) Bioflavonoids as blood sugar reducing agent. PCT(1998. 10. 20) PCT/KR 98/00325, US Patent Appl.
- 6) Method for prevention or treating elevated blood lipid and glucose level-related diseases by administrating neopesperidin dihydrochalcone. PCT(1999. 9. 15) PCT/KR 99/00548, US Patent Appl.
- 7) Composition containing cinnamic acid derivatives for preventing or treating elevated blood lipid level-related diseases. PCT(1999. 9. 15) PCT/KR 99/00551, US Patent Appl.
- 8) composition containing natural phenolic compounds for preventing or treating elevated blood lipid level-related diseases. PCT(1999. 9. 15) PCT/KR 99/00546, US Patent Appl.
- 9) composition containing rutin and quercetin for preventing or treating elevated blood lipid level-related diseases. PCT(1999. 9. 15) PCT/KR 99/00550, US Patent Appl.
- 10) Flavonoids derived from citrus peels as collagen-induced platelet aggregation inhibitor. PCT(1999. 8. 19) PCT/KR 99/00464, US Patent Appl. 09/389,860

국제특허 등록: (3 건)

- 1) Hesperidine and Hesperetin as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) Reductase Inhibitor, PCT Patent No. PCR/KR97/00190 (W098/16220) (1998. 6. 9)
- 2) Naringin and naringenin as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA(HMG-CoA) reductase inhibitor, PCT patent No. PCT/KR97/00191 (W098/16221), U.S. patent No. 5,877,208 (1999. 3. 2)
- 3) Citrus peel extract as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA(HMG-CoA) reductase inhibitor, PCT patent No. PCT/KR97/99192 (W098/16239), U.S. patent No. 5,792,461. (1998. 8. 11)

국내특허 출원: (32 건)

- 1) 감귤류 과피 추출물, 이로부터 분리 정제된 헤스페리딘 또는 나린진을 포함하는 심혈관 질환 예방 및 치료제 조성물, 96-045735 (1996. 6. 19)
- 2) 생강으로부터 추출된 콜레스테롤 에스터 전이 단백질 활성 저해용 화합물, 97-034195 (1997. 7. 22)
- 3) 감귤류 과피추출액을 포함하는 아실코에이-콜레스테롤-오르토-아실트랜스퍼라아제 저해제 조성물, 출원 97-055580 (1997. 10. 28)
- 4) 나린진 또는 나린제닌을 포함하는 아실코에이-콜레스테롤-오르토-아실트랜스퍼라아제 저해제 조성물, 출원 97-055579 (1997. 10. 28)
- 5) 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 포함하는 아실코에이:콜레스테롤-오르토-아실트랜스퍼레이즈 저해제 조성물, 출원 97-055578 (1997. 10. 28)
- 6) 비타민 씨와 귤피 추출 응축액을 활성성분으로 포함하는 3-하이드록시-3-메틸글루타린 코에이 환원 효소 활성 저해제 조성물, 출원 97-055581 (1997. 10. 28)
- 7) 대추추출물을 포함하는 콜레스테롤 강하 및 콜레스테롤 에스테르 전이 단백질 저해용 조성물, 출원 97-059425 (1997. 11. 12)
- 8) 대추추출물을 포함하는 혈압강하용 조성물, 출원 97-059426 (1997. 11.12)
- 9) 헤스페리딘을 포함하는 혈압강하용 조성물, 출원 97-059427 (1997. 11. 12)
- 10) 감귤류 과피 추출액을 포함하는 혈압강하용 조성물, 출원 97-59428 (1997. 11. 12)

- 11) 헤스페리딘을 포함하는 간 질환의 예방 및 치료용 조성물, 출원 98-010888 (1998. 3. 28)
- 12) 나린진을 포함하는 간 질환의 예방 및 치료용 조성물, 출원 98-010888 (1998. 3. 28)
- 13) 나린진 또는 나린제닌을 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물, 출원 98-011450 (1998. 4. 1)
- 14) 성인병 예방에 유익한 식용양념, 출원 98-012410 (1998. 4. 8)
- 15) 감귤류 과피 분말 또는 과피 추출물을 포함하는 기능성 건강 식품, 출원 98-012411 (1998. 4. 8)
- 16) 대추추출물 및 감귤류 과피 추출물을 포함하는 지질대사 개선 및 혈압강하용 조성물, 출원 98-012818 (1998. 4. 10)
- 17) 감귤류 과피 추출물을 포함하는 건강 개선용 기능성 음료, 출원 98-013283 (1998. 4. 14)
- 19) 고기능성 감귤류 주스, 출원 98-013284 (1998. 4. 14)
- 19) 기능이 개선된 귤피차, 출원 98-013285 (1998. 4. 14)
- 20) 나린진 또는 나린제닌을 포함하는 혈소판 응집 억제용 조성물, 출원 98-020561 (1998. 6. 3)
- 21) 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 포함하는 혈소판 응집 억제용 조성물, 출원 98-020562 (1998. 6. 3)
- 22) 바이오플라보노이드 화합물을 포함하는 혈당강하용 조성물, 출원 98-037958 (1998. 9. 15)
- 23) 루틴 및 퀘세틴을 포함하는 고지혈증, 동맥경화증 및 간 질환의 예방 및 치료용 조성물, 출원 98-037959 (1998. 9. 15)
- 24) 신남산 유도체를 포함하는 고지혈증, 동맥경화증 및 간 질환의 예방 및 치료용 조성물, 출원 98-037960 (1998. 9. 15)
- 25) 탄닌 또는 탄닌 유래 페놀성 화합물을 포함하는 고지혈증, 동맥경화증 및 간 질환의 예방 및 치료용 조성물, 출원 98-037961 (1998. 9. 15)
- 26) 디오스민을 포함하는 동맥경화증 및 고지혈증의 예방 및 치료용 조성물, 출원 98-037962 (1998. 9. 23)
- 27) 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘을 포함하는 고지혈증, 동맥경화증, 간 질환, 고혈당증의 예방 및 치료용 조성물, 출원 98-037963 (1998. 9. 15)
- 28) 바이오플라보노이드계 화합물을 포함하는 혈청 고밀도 지단백질 증가용 조성

- 물, 출원 99-043909 (1999. 10. 20)
- 29) 헤스페리딘을 포함하는 하이드록시메틸글루타릴-코에이 환원효소 활성 저해용 조성물, 출원 99-002189 (1999. 1. 25)
- 30) 나린진을 포함하는 하이드록시메틸글루타릴-코에이 환원효소 활성 저해용 조성물, 출원 99-002202 (1999. 1. 25)
- 31) 성인병 예방에 유용한 양념 조성물, 출원 99-011996 (1999. 4. 7)
- 32) 신남산 유도체를 포함하는 고농도 혈중 지질 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물, 출원 99-039480 (1999. 9. 15)
- 33) 대추 추출물을 포함하는 콜레스테롤 강하 및 콜레스테롤 에스테르 전이단백질 저해용 조성물, 출원 99-041275 (1999. 9. 27)
- 34) 대추 추출물을 포함하는 혈압 강하용 조성물, 출원 99-041276 (1999. 9. 27)

제 2 절 대외기여도

우리나라에서 생산되는 농산물, 과채류, 산채류, 약용식물 등을 탐색하여 건강에 유익하거나 질병 억제에 유익한 생체활성물질을 탐색하고, 이를 함유하는 특용작물을 개발 보급하고, 이들 성분 및 작물의 응용 가공 기술을 개발하면 국제 경쟁에서 승산이 있는 새로운 농업분야 산업의 육성을 위하여 본 연구과제를 수행하였다.

우리나라는 오래 전부터 동의보감 등에서 볼 수 있듯이 생약성분함유 약용식물을 이용한 민간요법이 개발되었으며 이들의 연구자료를 이용하여 현대적인 분석기술 및 생명공학기술을 도입할 경우 신규 고성능 활성물질을 자생의 농산물 및 식물들로부터 추출이 가능하다. 또한 유럽, 미국 등 서양에서 청정농산물에 관한 관심, 건강에 관한 관심이 급증하여 천연물을 이용한 건강보조식품의 소비량이 급증하고 있으며, 최근 미국에서는 FDA에서 식물성분 추출액 및 이들 성분의 이용에 관해 공식으로 인정할 움직임이며 건강유지, 질병예방용 기능성 생물소재시장이 크게 확대될 전망이다.

따라서 본 연구에서는 굴피 flavonoids 및 굴피추출액을 이용하여 성인병중에 큰 비중을 차지하는 심장순환기 질환인 고지혈증 및 동맥경화증에 대한 효능 검증을 실시하여, 최초로 고지혈증 및 동맥경화증에 대한 예방 효과를 입증하였으며, 최근에 국내외로 그 중요성이 부각되고 있는 식품의약(Nutraceuticals) 개발 측면에 파급 효과가 클 것으로 생각된다.

또한 지금까지 알려져 온 것처럼 심장순환기 질환인 고지혈증 및 동맥경화증은 일

단 발병하면 완전한 치료는 대단히 어렵다는 점을 감안할 때, 치료보다는 예방에 역점을 두고, 약물 독성이 없으며, 안전하여 장기간 복용이 가능한 식품 원료로부터 생산된 유용물질의 활용 측면에서 대단한 의의가 있다고 판단된다.

결론적으로 본 연구과제의 연구결과로부터 감귤과피로부터 Flavonoids의 대량 추출 방법을 확립하였으며, 감귤과피에 포함된 flavonoids 및 과피추출액을 쥐, 토끼 등의 실험동물에 투여함으로써 고지혈증 및 동맥경화증의 예방 효과를 입증하였다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로하여 보다 많은 새로운 제품 개발이 가능할 것으로 생각되며, 약리 활성의 작용 기작 규명을 통해 심장순환기 질환의 예방 및 치료를 위한 이론적 근거를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 감귤피분말, 감귤 flavonoids를 함유하는 식품의약(Nutraceutical) 또는 건강보조 식품을 개발하여 산업화하고자 하며, 한편으로 국내 타 식품업체를 통한 신제품 응용 개발이 가능할 것이다.
2. 감귤 부산물 등 농산부산물을 이용하여 고부가가치 제품 생산의 가능성을 제시함과 동시에, 제주도 감귤협동조합 등과 연계하여 무공해 감귤을 생산하고 현지 추출 공장 설립을 통해 원료 조달 및 가공을 자체적으로 수행하고자 한다.
3. 본 연구팀이 출원한 국내 및 해외 특허를 바탕으로, 감귤류의 생산과 소비가 국내에 비해 월등하게 많은 미주지역의 외국업체에 대한 기술이전을 통한 사업화가 추진 중이다.
4. 동물실험을 통해 감귤피분말, 감귤피 추출액, 감귤 flavonoids의 고지혈증, 동맥경화증 및 간기능 보호작용이 있음을 확인하였다. 따라서 고지혈증 및 동맥경화증 환자들을 대상으로 한 임상 연구가 이루어져야 할 것이다.

여 백

제 6 장 참고문헌

1. Food Pharmacy. 1989. Jean Carper, Betam Books
2. Human Medicinal Agents from Plants, Kinghorn, A. D. and M. F. Baladrin(eds).1993. ACS, Washington D.C
3. Ross. R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis:a perspective for the 1990s. Nature 362:801-809
4. Lagrost, L. 1994. Regulation of cholesteryl transfer protein(CETP) acitivity:review of *in vitro* and *in vivo* studies. BBA 1215:209-236
5. Kathawala, F.G and J.G Heider. 1991. Acyl CoA: cholesterol acyltransferase inhibitors and lipid-lipoprotein metabolism In Antilipidemic Drugs. Witiak, D. T., H. A. I. Newman and D. R. Feller(eds). pp 159-195
6. Stroke : Trends, Treatments and Markets. C. D. R. Dunn 1995. SCRIP Reports. PJB Publications Ltd., London
7. Tapparelli, C., R. Metternich, C. Ehrhardt, and N. S. Cook. 1993. Synthetic low-molecular weight thrombin inhibitors : molecular design and pharmacological profile. TIPS 14:366-375
8. 먹으면 치료가 되는 음식 672. 1994. 학원사
9. 산야초 치료법. 1994. 송효정 저. 국일문화사
10. 동의민간요법. 1995. 신재용 저. 국일미디어
11. 약이되는 산야초. 1993. 권영한 저. 전원문화사
12. 약이되는 한국의 산야초. 1994. 김태정 저. 국일문화사
13. Komai, T and Y. Tsujita. 1994. Hepatocyte selectivity of HMG-CoA reductase inhibitors DNA&P 7:279-288.
14. Bergstrom J. D. et. al. 1993. Zaragolic acids: a family of fungal metabolites that age picomolar competitive inhibitors of squalene synthase PNAS 90:80-84.
15. Dawson, M. J. et. al. 1991. The squalestatins, novel inhibitors of squalene synthase produced by a species of Phoma. J. Antibiotics 45:639-647
16. Tomoda, H., H. Nishida, R. Masuma, J. Cao., S. Okuda and S. Omura. 1991. Purpactins, new inhibitors of ACAT produced by *Penicillium purpurogenum*. J.

Antibiotics 44:136-143

17. 삼공주식회사(1992). 신규 화합물 epi cohliquinone A 공개특허 공보 특개평 4-334383
18. Naganuma, S., K. Sakai, K. Hasumi, and A. Endo, 1992. Acaterin, a novel inhibitor of ACAT produced by *Pseudomonas* sp. A92. *J. Antibiotics* 45:1216-1221
19. Park, J.K., K. Hasumi and A. Endo. 1993. Inhibition of ACAT by helmintosporol and its related compounds. *J. Antibiotics* 46:1303-1305
20. Hasumi K., C. Shinohara, T. Iwanaga and A. Endo. 1993. Lacteritin, A new inhibitors of ACAT produced by *Gibberella laleritum* IFO 7188. *J. Antibiotics* 46:1782-1787.
21. Shinohara C., K. Hasumi, Y. Takei and A. Endo. 1994. *J. Antibiotics* 47 : 163-167.
22. Tomoda, H., H. Nishida, X. H. Huang, R. Masuma, Y. K. Kim and S. Omura. 1992. New Cyclodepsipeptides, Enniatins D, E, and F produced by *Fusarium* sp. F01305. *J. Antibiotics* 45:1207-1215.
23. Tomoda, H., X. H. Huang, H. Nishida, R. Masuma, Y. K. Kim and S. Omura. 1992. Glisoprenins, new inhibitors of ACAT produced by *Gliocladium* sp. F01513 *J. Antibiotics* 45:1202-1206.
24. Tomoda, H., Y. K. Kim, H. Nishida, R. Masuma and S. Omura, 1994. Pyripyropenes, novel inhibitors of ACAT produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiotics* 47:148-153.
25. Huang, X. H., H. Tomoda, H. Nishida, R. Masuma, and S. Omura. 1995. Terpendoles, novel ACAT inhibitors produced by *Albophoma yamanashiensis*. *J. Antibiotics* 48:1-4.
26. Tapparelli, C., R. Metternich, R. Gfeller, B. Gafner and M. Powling. 1995. Antithrombotic activity in vivo of SDZ 217-766, a low-molecular weight thrombin inhibitor in comparison to heparin. *Thrombosis and Haemostasis* 73:641-647.
27. Seiler, S.M., M. Peluso, I. M. Michel, H. Goldenberg, J. W. Fenton II, D. Riexinger, and S. Natarajan. 1995. Inhibition of thrombin and SFLLR-peptide stimulation of platelet aggregation. *Biochemical Pharmacology*

- 49:519-528.
28. Green, G.D. and E. Shaw. 1979. Thiobenzyl Benzyloxycarbonyl-L-Lysinate, substrate for a sensitive colorimetric assay for Trypsin-Like Enzymes. *Analytical Biochem.* 93:223-226.
 29. Pattnaik, N. M., A. Montes, L. B. Hughes & D. B. Zilvermit. 1978. Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 530:428.
 30. Kato, H., T. Nakanishi, H. Arai, H. I. Nishida & T. Nishida. 1989. Purification, microheterogeneity, and stability of human lipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* 264:4082.
 31. Rehberg, E. F., K. A. Greenlee, G. W. Melchior & K. R. Marotti. 1994. Purification of human cholesteryl ester transfer protein by affinity chromatography on immobilized triazine dyes. *Protein Expression & Purification.* 5:285.
 32. Hesler C. B., Swenson T. L., and Tall A. R. 1987. Purification and characterization of human plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Biol. Chem.* 262:2275-2282.
 33. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, CSG. 1974. "Enzymetic determination of total serum cholesterol." *Clinical Chemistry* 20:470-475.
 34. Warnick G.R., *et al.* 1982. Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin. Chem.* 28: 1379-1388.
 35. Erickson, S. K., M. A. Shrewsbury, C. Brooks & D. J. Meyer. 1980. Rat liver acyl-CoA: cholesterol acyltransferase: its regulation *in vivo* and some of its properties *in vitro*. *J. Lipid Res.* 21:930-945.
 36. Lowry, O. H. & N. T. Rosebrough. 1951. Protein measurement with the filin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
 37. Brecher, P. & C. Chen. 1980. Properties of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in aortic microsomes from atherosclerotic rabbit. *Biochim. Biophys. Acta* 617:458-471.
 38. Esper E, Runge WJ, Gunther R, Buchwald H. 1993. Natural history of atherosclerosis and hyperlipidemia in heterozygous WHHL [WHHL-Hh] rabbits II. Morphometric evaluation of spontaneously occurring aortic and coronary lesion.

J. Lab. Clin. Med. 121: 103-110..

39. Fogt F. and Nanji AA. 1996. Alteration in nuclear ploidy and cell phase distribution of rat liver cell in experimental alcoholic liver disease: relationship to antioxidant enzyme gene expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 136: 87-93.
40. Keegan A., Martini R. and Batey R. 1995. Ethanol-related liver injury in the rat: a model of steatosis, inflammation and pericentral fibrosis. *Journal of Hepatology* 23: 591-600.

제 1 위탁연구과제

심혈관 질환 예방치료 활성성분 및 물질의
in vivo 활성 검정 연구

여 백

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산자원으로부터 심혈관질환 예방·치료활성 신소재 개발에 관한 연구” 과제 (위탁과제 “심혈관 질환 예방치료 활성성분 및 물질의 *in vivo* 활성 검정 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 1월 5일

위탁연구기관명 : 경북대학교

연구책임자 : 박용복

연 구 원 : 최명숙

여 백

요 약 문

I. 제 목

심혈관 질환 예방치료 활성성분 및 물질의 *in vivo* 활성 검정 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

경제성장과 소득증대로 전반적인 생활 수준의 향상으로 인한 식생활의 변화로 영양 과잉이나 영양 불균형에 의한 고혈압, 허혈성 심질환, 동맥경화등의 만성질환이 증가되고 있다. 최근 고지방 혹은 고콜레스테롤 식이는 노화 및 뇌혈관 질환, 심혈관 관계질환, 암과 같은 만성질환의 원인이 된다고 알려졌으며, 이들 질환은 항산화 효과를 가지는 식품의 섭취를 통해 그 예방과 치료가 가능하다고 밝혀졌다.

항산화물질중은 superoxide anion radical, hydroxy radical, peroxy radical과 peroxy nitrite의 포착작용(Robak & Glewski, 1988., Husain et al, 1987)과 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써(Sies & Krinsky, 1995., Martin et al, 1996) 지질 과산화와 LDL(low-density lipoprotein)의 산화를 방지하고(Michael et al, 1994), cyclo-oxygenase와 lipoxygenase의 활성을 저해함으로써 혈소판 응집을 억제하여(Miranda et al, 1991) 관상 심장질환, 동맥경화증, 혈전증, 고혈압을 예방한다. 그의 항산화 비타민들은 항암성, 항돌연변이성, 항염성, 항알레르기성, 항바이러스성을 가진다고 보고되었다(Marie et al, 1995). Flavonoid는 최근 안정한 항산화 물질로서 큰 관심을 끌고 있으며 국내에서도 우리 나라에서 자란 고유 식물종내의 flavonoid에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 우리나라 고유과실인 제주 감귤과 유자 과피내의 flavonoid의 종류 및 함량 조사에서 naringin과 hesperidin이 주된 flavonoid로 밝혀졌고(Eun et al, 1996), hesperidin은 혈압강하 효과(Son et al, 1992), 항염증성 효과와 진통 효과(Galati et al, 1994)가 있으며 naringin은 항균작용이 있는 등(Han et al, 1988) 이들의 생리활성이 보고되고 있다.

본 연구에서는 감귤피 추출액, 인삼 및 다양한 flavonoid (hesperidine, hesperetin, naringin, naringenin, cinmate and its derivatives, rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, and tannin)의 혈중 콜레스테롤 강하 기능 시험 결과의 보충이 흰쥐의 지질 저하작용에 미치는 영향을 평가하였다.

III. 연구 개발 내용 및 범위

주요 연구내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

1. 흰쥐를 이용한 감귤피와 대추 추출물의 *in vivo* 역가 실험

1) 혈장 지질수준 및 HMG-CoA reductase 및 ACAT 활성변화에 미치는 영향

2. *In vitro* test를 통한 시험물질들의 효소 저해활성 점검

1) HMG-CoA reductase 활성 저해도

2) Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) 활성 저해도

3. High cholesterol diet를 급여한 흰쥐를 사용하여 귤피추출물과 그 구성성분에 대한 *in vivo* 역가 실험 수행

1) 혈장 지질 대사에 미치는 영향

2) 조직 지질함량에 미치는 영향

3) 간의 콜레스테롤 항상성에 미치는 영향

4) 분변 스테롤 배설에 미치는 영향

4. High cholesterol 과 high fat diet를 동시 급여한 흰쥐를 대상으로 귤피추출물과 그 구성성분에 대한 *in vivo* 역가 실험

1) 혈장 지질 대사에 미치는 영향

2) 조직 지질함량에 미치는 영향

3) 간의 콜레스테롤 항상성에 미치는 영향

4) 분변 스테롤 배설에 미치는 영향

5. 대추추출물의 효능 및 naringin과 병합투여 효능확인을 위한 동물실험

1) 장기조직의 증량에 미치는 영향

2) 혈장지질 profile에 미치는 영향

6. Citrus bioflavonoid와 인삼이 vitamin E 수준이 식이에 보충된 경우 고지혈증 예방효과에 미치는 영향분석

1) 혈중 지질강하에 미치는 영향

- 2) 조직 지질함량에 미치는 영향
- 3) 간의 콜레스테롤 항상성에 미치는 영향
- 4) 간조직의 항산화효소 활성화에 미치는 영향
- 5) 혈장 과산화지질 수준과 Vit. E 농도에 미치는 변화
- 6) 분변 스테롤 배설에 미치는 영향

7. Cinnamate derivatives 와 타 bioflavonoid들 (rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, tannin)의 혈중 콜레스테롤 강하기능 분석

- 1) 혈장지질 대사에 미치는 영향
- 2) 간조직의 형태학적 변화에 미치는 영향
- 3) 간의 콜레스테롤 항상성에 미치는 영향

IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

- 1) 감귤피 추출물의 flavonoid 성분인 hesperidine, hesperetin, naringin, naringenin 의 투여는 동물실험에서 강력한 혈중 지질저하 작용을 나타내었다.
- 2) Hesperidine, hesperetin, naringin, naringenin의 콜레스테롤 저하작용 기작은 간의 HMG-CoA reductase 와 ACAT 활성화도 저해를 통하여 증재되었다.
- 3) 고지혈증 조건에서 naringin의 콜레스테롤 저하작용은 HMG-CoA reductase inhibitor인 Lovastatin의 작용보다 우수하게 나타났다.
- 4) 감귤피 엑기스와 대추분말을 양파, 마늘 및 생강과 함께 양념소스로 제조하여 고 콜레스테롤혈증 흰쥐에 투여한 경우 혈중 콜레스테롤 저하기능을 보였다.
- 5) 식이 비타민 E 수준이 낮을 경우 naringin과 hesperidin의 보충은 식이에 부족한 Vit. E의 체내작용을 부분적으로 보조 또는 대체하는 것으로 평가되었다.
- 6) Cinnamate와 그 유도체(4-hydroxy hydrocinnamate, 3,4-dihydroxy cinnamate), rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, 및 tannin의 투여는 고지혈증 동물의 지질대사를 개선시켜 혈중 지질농도를 정상화 또는 저하시키는 작용이 있다.

2. 활용에 대한 건의

- 1) 동물실험에서 독성이 없는 것으로 나타난 이들 기능성 bioflavonoid들의 효능은

고지혈증 환자들을 대상으로 한 임상 연구에서 지속적인 재평가가 이루어지면 조기 산업화가 가능하다..

2) 본 연구결과에서 증명된 감귤피의 지질저하작용을 근거로하여 식품 폐기물인 감귤피를 활용할 수 있다.

3) 감귤피 bioflavonoid, cinnamate 유도체, quercetin dihydrate, gallic acid, 및 tannin은 지질대사에서 확인된 이들의 지질저하 작용을 근거로하여 기능성 식품개발에 이용될 수 있다.

4) HMG-CoA reductase 저해제 기능을 지닌 것으로 나타난 bioflavonoid들은 약품 개발분야에 유용한 기초자료를 제공하며 그 활용도 적극 권장된다.

SUMMARY

I. Title

Studies on prevention or treatment effect of cardiovascular disease by active biocomponents *in vivo*

II. Purpose and Objectives

Hypercholesterolemia has received attention as a risk factor for the development of coronary artery disease. It is important to decrease excess levels of cholesterol to an amount consistent with the maintenance of normal body function which can also decrease a risk for developing atherosclerosis. The concentration of plasma cholesterol in the body can be regulated via biosynthesis of cholesterol, the removal of cholesterol from the circulation, the absorption of dietary cholesterol, and the excretion of cholesterol via bile and feces. During the last decades, numerous researchers have developed effective plasma cholesterol-lowering agents.

Some bioflavonoid compounds are associated with the prevention of chronic diseases such as cancer and hyperlipidemia. Among the naturally occurring flavonoids, some are pharmacologically evaluated as a potential anticancer agent and antioxidants. The present study was conducted to examine the effects of various bioflavonoids on cholesterol metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. The effects on the plasma and hepatic lipids, on the cholesterol-regulating hepatic enzymes, hepatic antioxidant enzymes and on the fecal neutral sterols were analyzed.

III. Scope of The Study

1. *In vivo* efficacy test for tangerine peel extract and jujube extract using animal study
 - 1) Effects of plasma lipids and hepatic HMG-CoA reductase & ACAT activities
2. Enzyme inhibitory activities of test material *in vitro* test

- 1) HMG-CoA reductase inhibitory activities
- 2) Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) inhibitory activities
3. *In vivo* efficacy test for tangerine peel extract and its bioflavonoid in high cholesterol fed rats
 - 1) Effects on plasma lipid changes
 - 2) Effects on hepatic lipid changes
 - 3) Effects on cholesterol homeostasis between plasma and tissues
 - 4) Effects on excretion of fecal neutral sterols
4. *In vivo* efficacy test for tangerine peel extract and its bioflavonoid in high -fat & high-cholesterol fed rats : Comparison with effects of Lovastatin
 - 1) Effects on plasma lipid metabolism
 - 2) Effects on hepatic lipid changes
 - 3) Effects on cholesterol homeostasis
 - 4) Effects on excretion of fecal neutral sterols
5. *In vivo* efficacy test for spice sources made with various combination of naringin and jujube extract
 - 1) Effects on plasma lipid-lowering action
 - 2) Effects on cholesterol homeostasis
6. *In vivo* efficacy test for various combination of citrus bioflavonoid, Vit. E and Ginseng
 - 1) Effects on plasma lipid-lowering action
 - 2) Effects on hepatic lipid changes
 - 3) Effects on maintenance of cholesterol homeostasis
 - 4) Effects on activities of hepatic antioxidant enzyme
 - 5) Effects on changes of plasma lipid peroxides and Vit. E level
 - 6) Effects on excretion of fecal sterols
7. Cholesterol-lowering action of cinnamate derivatives, rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, and tannin
 - 1) Effects on plasma lipid changes

2) Effects on maintenance of cholesterol homeostasis

IV. Results and Applications

1. Results of this study

- 1) The tangerine peel extract and its bioflavonoid exhibits the cholesterol-lowering action.
- 2) The mode of action for tangerine peel extract and its bioflavonoid is their enzyme inhibitory activities against hepatic HMG-CoA reductase and ACAT.
- 3) Cholesterol-lowering action of naringin is more excellent than Lovastatin that is a well-known HMG-CoA reductase inhibitor.
- 4) Tangerine peel extract and jujube extract are good additives for functional spice sources with cholesterol-lowering properties.
- 5) Naringin and hesperidin can partially be replaced with Vit. E in cholesterol metabolism.
- 6) Cinnamate derivatives, quercetin dihydrate, gallic acid, and tannin are very effective for improving lipid metabolism in hyperlipidemic rats.

2. Application of results

- 1) The various kinds of flavonoids that were proved to exhibit cholesterol-lowering in this study can be utilized for development of the functional foods or health foods.
- 2) By applying these bioflavonoids to human clinical test, they can be reevaluated for human use.
- 3) Tangerine peel waste can be recycled for a production of functional food in food industry.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	107
1. Flavonoid	107
2. Plasma lipoprotein & cholesterol metabolism	108
3. Antioxidant defense mechanism	110
Chapter 2. Research Methods	113
1. <i>In vivo</i> test for tangerine peel and jujube extract(animal experiment I)	113
2. <i>In vitro</i> test for enzyme inhibitory activities of test substances	115
3. <i>In vivo</i> test for tangerine peel extract and its component in high cholesterol-fed rats (animal experiment II)	117
4. <i>In vivo</i> test for tangerine peel extract and its component in high cholesterol & high fat-fed rats (animal experiment III)	121
5. <i>In vivo</i> test for jujube extract & it combined effect with naringin and spice source (animal experiment IV)	124
6. Effects of Citrus bioflavonoid & Ginseng with different levels of dietary vitamin E in high-cholesterol fed rats (animal experiment V)	128
7. Cholesterol-lowering action of cinnamate derivatives & other bioflavonoid (rutin, quercetin dihydrate, gallate, tannin) (animal esperiment VI)	131
Chapter 3. Results and discussion	135
1. <i>In vivo</i> test for tangerine peel and jujube extract(animal experiment I)	135
2. <i>In vitro</i> test for HMG-CoA reductase & ACAT inhibitors	138
3. <i>In vivo</i> test for tangerine peel extract and its component in high cholesterol-fed rats (animal experiment II)	142
4. <i>In vivo</i> test for tangerine peel extract and its component in high cholesterol & high fat-fed rats (animal experiment III)	145
5. <i>In vivo</i> test for jujube extract & it combined effect with naringin and spice source (animal experiment IV)	148

6. Effects of Citrus bioflavonoid & Ginseng with different levels of dietary vitamin E in high-cholesterol fed rats (animal experiment V)	150
7. Cholesterol-lowering action of cinnamate derivatives & other bioflavonoid (rutin, quercetin dihydrate, gallate, tannin) (animal experiment VI)	161
Chapter 4. References	171
Supplements	177

목 차

제 1 장 서론	107
제 1 절 Flavonoid에 대하여	107
제 2 절 혈장 지단백질과 콜레스테롤 대사	108
제 3 절 생체의 항산화 방어기전	110
제 2 장 연구내용 및 방법	113
제 1 절 흰쥐를 이용한 감귤피와 대추 추출물의 <i>in vivo</i> 역가 실험(동물실험 I)	113
제 2 절 <i>In vitro</i> test를 통한 시험물질들의 효소 저해활성 점검	115
1. Microsome 분리	115
2. HMG-CoA Reductase Assay 방법	115
3. HMG-CoA Reductase 활성저해도 측정법	116
4. ACAT 활성도 측정	116
제 3 절 High cholesterol diet를 급여한 흰쥐를 대상으로 한 귤피추출물과 그 구성성분에 대한 <i>in vivo</i> 역가 실험(동물실험 II)	117
제 4 절 High cholesterol 과 high fat diet를 동시 급여한 흰쥐를 대상으로 귤피추출물과 그 구성성분에 대한 <i>in vivo</i> 역가 실험(동물실험 III)	121
제 5 절 대추추출물의 효능 및 naringin과 병합투여 효능확인을 위한 동물실험(동물실험 IV)	124
제 6 절 Citrus bioflavonoid와 인삼이 vitamin E 수준이 식이에 보충된 경우 고지혈증 예방효과에 미치는 영향분석(동물실험 V)	128
제 7 절 Cinnamate derivatives와 타 bioflavonoid들(rutin, quercetin dihydrate, gallate, tannin)의 혈중 콜레스테롤 강하기능(동물실험 VI)	131
제 3 장 연구결과	135
제 1 절 흰쥐를 이용한 추출물의 <i>in vivo</i> 역가 실험	135
1. 대추추출물과 감귤피추출물의 <i>in vivo</i> 효능	135
2. 감귤피 추출액과 hesperidin의 <i>in vitro</i> 에서의 HMG-CoA reductase저해 활성	136
제 2 절 <i>In vitro</i> 에서 HMG-CoA reductase 와 ACAT 활성저해 물질의 탐색	138
제 3 절 High cholesterol diet 를 급여한 동물들을 대상으로 귤피추출물과 그 구성	

성분에 대한 <i>in vivo</i> 역가 실험결과(동물실험 II)	142
제 4 절 High cholesterol 과 high fat diet를 동시 급여한 흰쥐를 대상으로한 글피 추출물과 그 구성성분에 대한 <i>in vivo</i> 역가 실험결과(동물실험 III)	145
제 5 절 대추추출물의 효능 및 naringin과 병합투여 효능확인을 위한 동물실험 결과 (동물실험 IV)	148
제 6 절 Citrus bioflavonoid와 인삼이 vitamin E 수준이 다른 diet에 보충된 경우 고지혈증 예방효과에 미치는 영향분석(동물실험 V)	150
제 7 절 Cinnamate derivatives와 타 bioflavonoid들(rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, tannin)의 혈중 콜레스테롤 강하 기능(동물실험 VI)	161
 제 4 장 참고문헌	 171
 부록	 177
부록 1. 실험재료 및 방법	177
1. 시료 수집	177
2. 혈장지질 분석	177
3. 간조직의 cholesterol과 triglyceride 함량 측정	178
4. Hepatic HMG-CoA reductase 활성도 측정	178
5. Hepatic Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) 활성도 측정	179
6. 혈장의 과산화 지질 측정	179
7. 혈장 vitamin E 수준 측정	180
8. Hepatic antioxidative enzyme 활성도 측정	181
9. Fecal neutral sterol 정량	182
10. Total bile acid 정량	183
11. 통계분석	183
부록 2. 연구성과	184
가. 학술지 논문발표실적	184
나. 특허출원 실적	185

제 1 장 서 론

제 1 절 Flavonoid에 대하여

식물조직의 표면에 주로 존재하는 것으로 알려진 flavonoids는 diphenyl-propane($C_6-C_3-C_6$)을 기본구조로 하는 물질로서 rhamnose, glucose, rutinose 등의 당류와 결합하여 배당체로 존재하거나 또는 자연에서 유리상태로 존재한다(Bate-Smith, 1954). 그 중 flavonoid는 담황색 또는 노란색을 띠는 색소 화합물로서 산소고리 주위의 구조적 특징에 따라 flavonones, flavones, flavonols, isoflavonoids, anthocyanins와 flavans의 6종류로 분류된다. 주로 citrus fruit에 존재하는 것이 hesperidin, neohesperidin, narirutin 그리고 naringin과 같은 flavonones이다(Harbone, 1988). 주로 과일, 야채, 견과류, 식물의 뿌리, 줄기, 껍질, 차, 커피, 포도주 등에 널리 분포되어 있는 천연의 저분자 물질로 자연에 약 4000종이나 있는 것으로 알려져 있다(Alexander & Spers, 1985., Hertog et al, 1992). 그 중 hesperidin은 citrus 껍질에 많이 있는 작은 분자로서 lipase inhibitors로 작용하여 10%의 hesperidin을 먹인 동물실험에서 중성지질 농도가 월등히 저하됨(Kawaguchi et al, 1997)을 보인 바 있으며 normolipidemic rat에서 혈장 중성지질, LDL-콜레스테롤 감소와 동시에 HDL-콜레스테롤의 증가를 보였다(Monforte et al, 1995).

Flavonoid는 천연물에서 분리된 대표적 항산화 물질로 분류되기도 하며 phenolic acid에 속하는 polyphenol 물질과 유사한 항산화기능을 가진다. Flavonoid의 항산화 연구는 비효소적 지질 과산화의 inhibitor를 사용한 항산화 활성 시험(Mora et al, 1990)으로 부터 시작되었으며 지금까지 in vivo 또는 in vitro system을 통한 다양한 항산화 활성 테스트가 이루어졌다. Flavonoids의 항산화 물질들은 체내에서 자유기의 생성과 전파를 억제하는데 참여한다(Harman, 1982). 또한 항산화 기능과 산화 촉진인자인 금속이온과 착염을 형성하는 기능으로 인해 free radical이나 electrophiles, 지질 과산화물 생성에 의한 세포, 조직, 기관의 손상 억제, 노화 방지, 심혈관 순환계 질환 예방효과, 항암효과 까지 있는 것으로 밝혀지고 있다(Isabelle et al, 1993). 이는 flavonoid가 중금속류와 킬레이트 착화합물을 형성하여 금속들이 산화 촉진제로 작용하지 못하도록 하며 또한 스스로가 항산화제로 작용하여 이미 생성된 free radical을 없애는 radical scavenger로 작용한다(Igor et al, 1989., Isabelle et al, 1994)는 사실에 근거한다. 이러한 flavonoid의 항산화 작용에 대해서는 지금

까지 다양한 *in vitro* 실험결과가 보고되고 있으며 이에 반해 *in vivo* 연구는 아직도 많이 이루어져야 한다.

제 2 절 혈장 지단백질과 콜레스테롤 대사

혈장에 다량으로 존재하고 각 조직의 세포기능 유지 및 에너지 대사에 중요한 혈장지질에는 콜레스테롤, 중성지방, 인지질(phospholipids), 유리 지방산(*free fatty acids*) 등이 있다.

중성지방의 중요기능은 효율적인 에너지의 저장이다. 음식물내 중성지방은 장에서 부분적으로 가수분해된 후 십이지장과 근위부 공장에서 95%가 흡수된다. 중성지방의 가수분해 산물인 유리 지방산, 모노 글리세리드, 소량의 글리세롤 등은 장점막 세포막을 통과하여 세포내에서 결합되어 중성지방으로 합성된다. 콜레스테롤은 세포막과 지단백의 중요한 구성 성분이며, 담즙산과 스테로이드 호르몬의 전구물질이다. 대부분의 조직에서 합성 가능하나 주로 간과 소장 점막에서 합성된다. 콜레스테롤은 *acetyl-CoA*로 부터 형성되는데 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA(HMG-CoA)로 부터의 *mevalonate*의 합성이 콜레스테롤 생성의 율속단계이다. HMG-CoA는 간세포의 세포질과 미토콘드리아에 존재하며, 미토콘드리아에 있는 HMG-CoA는 주로 케톤체의 전구물질인데 반해서 세포질에 있는 HMG-CoA는 콜레스테롤 합성에 필요한 *mevalonate* 생성에 이용된다. 간에 의한 콜레스테롤 합성은 이 합성의 개입단계를 촉매하는 HMG-CoA reductase의 절대량과 활성의 변화로 조절된다(Stryer, 1987).

콜레스테롤은 음식물에서 얻거나 간에서 주로 생합성될 수 있다. 간조직에서의 콜레스테롤 합성속도는 음식물에서 흡수되는 콜레스테롤의 양에 매우 민감하게 변한다. 이 음성 되먹임 조절은 HMG-CoA reductase의 활성에 의해 매개 되는데 세포내로 유입되는 콜레스테롤 양이 많은 경우 HMG-CoA reductase 활성도와 LDL(*low density lipoprotein*) receptor 합성이 억제되며 이미 존재하고 있는 효소 분자들을 불활성화 시킨다. 반면 세포내로 유입되는 콜레스테롤 양이 적은 경우는 HMG-CoA reductase의 활성도가 촉진되고 LDL-receptor 합성이 증가되는 과정을 통해 세포내 콜레스테롤의 항상성이 유지된다.

콜레스테롤과 그 밖의 지방질들은 혈액에 용해될 수 있는 아포 지단백과 결합된 복합구조인 지단백(*lipoprotein*) 입자에 의해 특이한 표적 조직으로 운반된다(Fig. 1). 지단백 입자의 내부는 콜레스테롤 에스테르와 중성지질이 존재하고 극성 표면층

에는 아포 지단백, 인지질, 유리 콜레스테롤이 존재한다. 지단백질은 5가지로 분류되며 종류에 따라 조성과 밀도가 다르고 합성부위도 각기 다르다. Chylomicron은 소장 점막에서 주로 생성되며 주로 식사에서 섭취된 triglyceride를 함유하고 있다. 흉관을 통하여 순환혈액 내로 유입된 chylomicron은 근육과 지방조직 모세혈관벽에 위치한 lipoprotein lipase에 의해 triglyceride의 일부가 가수분해된 후, 남은 chylomicron remnant는 간에 흡수되어 분해된다. VLDL(Very Low Density Lipoprotein)은 triglyceride를 운반하며 간에서 합성된다. VLDL은 순환혈액 내에서 lipoprotein lipase에 의해서 triglyceride가 분해되면서 triglyceride와 콜레스테롤을 함유하는 IDL(Intermediate Density Lipoprotein)로 전환되며 이것이 일부는 간에서 분해되고 나머지는 주로 콜레스테롤을 함유하는 LDL로 전환된다. LDL은 주로 콜레스테롤을 필요로 하는 각종 세포막의 LDL receptor에 부착되어 endocytosis에 의해서 간과 말초조직에 흡수된다. LDL 합성 증가 또는 LDL 대사의 감소에 기인한 혈중 LDL 수준의 상승이 동맥경화의 원인이 되며 심혈관계 질환의 위험도와 가장 관계가 있다 (Steinberg et al, 1989). 또한 가족성 고콜레스테롤혈증의 동형 접합체에 있어서 LDL receptor의 결핍 현상은 혈장 LDL-cholesterol의 상승과 혈관내벽의 심한 콜레스테롤 축적 및 유아기의 심장마비 등의 원인이 된다(Goldstein et al, 1983).

HDL(High Density Lipoprotein)은 혈중 총 콜레스테롤의 20~30%를 운반하며 간과 장에서 합성되거나 VLDL과 chylomicron remnants가 일부 HDL로 전환된다. HDL의 작용은 조직에 침착된 콜레스테롤과 VLDL이 가진 콜레스테롤을 받아서 저장형인 콜레스테릴 에스테르 형태로 전환시켜서 미성숙 LDL에게 공급함으로써 콜레스테롤의 재순환 역할을 하며 지단백 대사에 필요한 각종 아포 지단백의 저장과 대사에 중요한 역할을 담당한다. 혈중 HDL의 감소 또한 동맥경화증의 한 위험인자로 알려지고 있다 (Schonfeld, 1989).

조직의 유리 콜레스테롤은 세포막의 생합성에 사용되거나 세포내에서의 저장되기 위해 다시 에스테르화될 수 있다. 조직내 유리 콜레스테롤 양이 증가되면 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase(ACAT)가 활성화되어 콜레스테롤의 에스테르화 반응이 활발해 진다(Schroepfer, 1982).

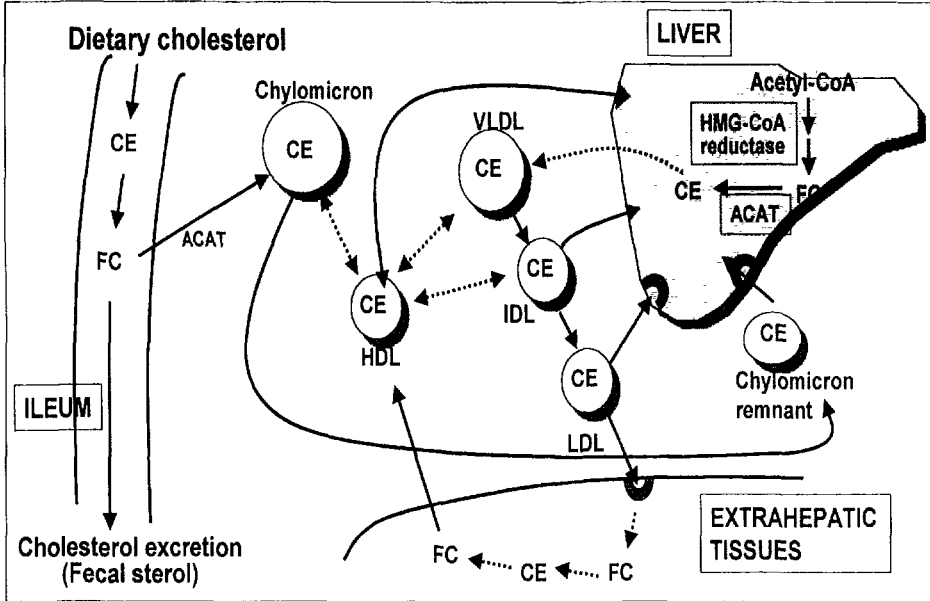


Fig. 1. Major cholesterol transport & metabolism in blood and liver. (FC: free cholesterol, CE: cholesteryl ester, Arrows indicate the direction of net transport.)

제 3 절 생체의 항산화 방어기전

생체 대사과정에서 생기는 전자는 전자 수용체인 산소 분자로 전달되어 물을 생성하며 이때 전자의 에너지는 에너지 생성에 이용된다. 그러나 산소는 전자배열의 특수성 때문에 물 생성외에 반응성이 높은 산소 산물로 변화되어 세포의 구성물질인 지질, 단백질, 다당류 및 핵산을 파괴하여 세포의 기능 저하를 초래한다. 음식물의 산화과정에서 생성되는 전자 4개를 받아 물로 환원되는 과정에서 산소일부가 한개의 전자만을 받아 superoxide radical($O_2^- \cdot$)이 되고, 이는 다시 자동적으로 보다 반응성이 강한 hydrogen peroxide(H_2O_2) 또는 hydroxy radical($HO \cdot$)로 전환된다. 이들을 반응성 산소물(reactive oxygen species), 활성산소(active oxygens) 또는 산소 라디칼(oxygen radicals)이라 한다. 따라서 생명체가 생명을 유지하기 위해 음식을 섭취하고 있는 한 산소 라디칼 생성을 피할 수 없다.

체내의 항산화 방어체계는 항산화 효소들과 항산화 비타민을 포함한다. 항산화 효소들은 제 1 방어체계로 유리 라디칼을 물이나 과산화수소로 환원시켜 유리 라디칼

의 초기 생성을 저지한다. 생체내에서 합성되는 내인성 항산화제인 metalloenzyme이 중요한 예로서 미토콘드리아와 세포질에는 Se을 함유한 GSH-Px(glutathione peroxidase)가 존재하고, 미토콘드리아 기질에는 Mn-superoxide dismutase(Mn-SOD), 그리고 세포질과 미토콘드리아 내막에는 Cu, Zn-SOD가 존재하고 있다(Packer, 1993). 한편 이미 생성된 라디칼에 의한 산화 연쇄반응 차단은 제 2 방어체계인 vitamin E, vitamin C, carotenoid등의 항산화 비타민에 의해 이루어진다(Packer et al, 1993). 그중 특히 Vit. E는 사람의 혈액과 모든 세포막에 존재하는 강력한 항산화제로서 미토콘드리아막의 과산화 방지로 자유라디칼에 의해 발생하는 지질 과산화의 연쇄반응을 종식시키는 역할을 한다. 또한 흡연과 같이 지질의 산화를 유발하는 스트레스에 노출되면 방어기작으로 catalase, SOD, GSH-Px의 작용이 유도되어 지질 과산화를 개시하는 활성산소를 제거함으로써(Chance et al, 1979) 산화 스트레스에 대한 적응반응을 보인다. 한편 동맥경화와 관련된 지용성 Vit. E의 작용으로 체내 LDL 산화억제는 잘 알려져 있다. LDL은 각종 산화 stress에 의해 산화형 LDL로 전환되기 쉽다. 혈액내에서 순환하던 LDL이 동맥내피로 스며들어온 후 내피세포나 그 밖의 이유로 산화되면 혈액으로 돌아가지 못하고 남아 동맥 내피에 지질을 축적시켜 동맥경화를 유도한다. LDL은 혈액에서 Vit. E의 중요 운반체이면서 자체내에 Vit. E와 같은 항산화제를 함유하고 있어 이들이 LDL산화를 억제하게 되는데 flavonoid 성분들이 이를 대신할 수 있음이 보고되었다(DeWhalley et al, 1990).

여 백

제 2 장 연구내용 및 방법

제 1 절 흰쥐를 이용한 감귤피와 대추 추출물의 *in vivo* 역가 실험(동물실험 I)

1차년도에는 CETP, ACAT, HMG-CoA reductase의 대량 assay system을 확립하였으며 혈장과 조직에서의 콜레스테롤 정량체계를 개선하였다. 또한 실험동물에 저해역가를 보이는 추출물 (대추추출물, 감귤추출물)을 투여하여 *in vivo* 활성을 검증하는 실험은 아래와 같이 수행하였다.

1. Test substances : ① 대추추출물 (분말)
② 감귤피 (액체) 추출액
③ Hesperidine (pure 분말)

2. 동물 실험 디자인 및 식이조성

동물실험은 Fig. 2와 같이 디자인하였다. 충북 음성군의 대한 실험동물 센터로부터 건강한 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley, 3주령)를 구입하였다. 사육실 온도는 24℃, 상대 습도는 55%를 유지시키고 8:00에서 20:00까지 12시간 간격으로 총 5주의 사육기간 동안 light cycle을 유지하여 개개의 stainless cage안에서 사육되었다. 처음 1주일 동안은 pellet형의 Lab-chow식이를 제공하면서 안정시켰고, 4주령(BW: 90~120g)되었을 때 난괴법(randomized block design)에 의해 4개의 group으로 나누었다. 실험 식이는 Table 1과 같이 lab. chow diet, 1.2% 대추추출 분말 diet, 6.3% 감귤피 추출액 diet 및 4.5% hesperidin diet로 조제하여 4주간 공급하였다.

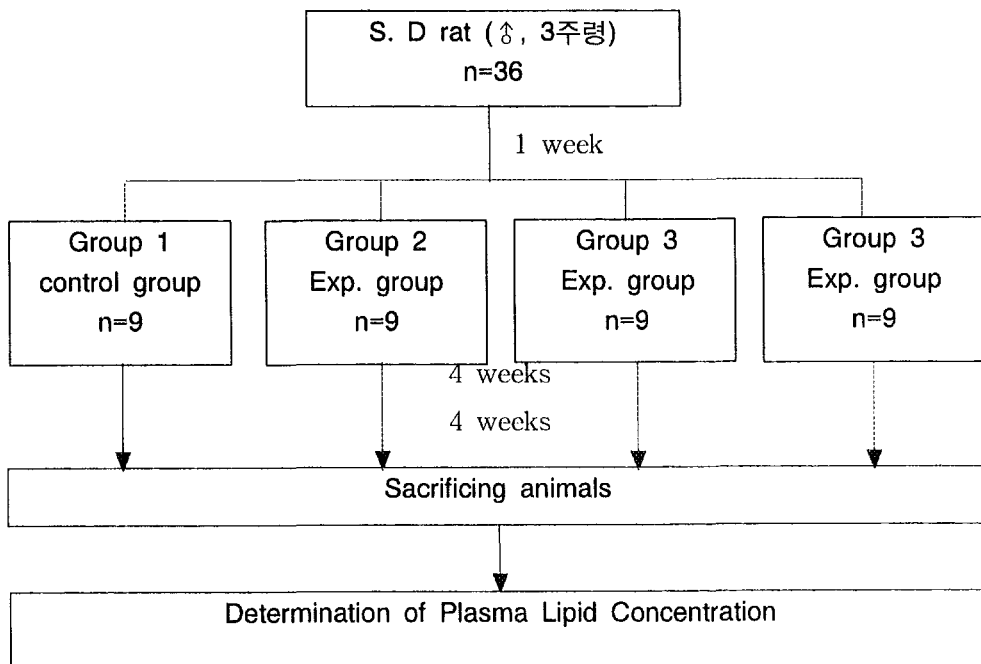


Fig. 2. Experimental design of animal study I.

Table 1. Composition of experimental diets

Dietary Groups		Composition
Control Group	G-1	Lab Chow diet
Experimental Group	G-2	Control diet + 1.2% 대추추출분말
	G-3	Control diet + 6.3% 오렌지 진피 추출액 (0.1% hesperidin)
	G-4	Control diet + 4.5% pure hesperidin

제 2 절 *In vitro* test를 통한 시험물질들의 효소 저해활성 점검

콜레스테롤을 저하시키는 기능이 있다고 가정되는 시험물질을 선택하여 일차적으로 이들 시험물질에 대해 *in vitro* 시험관법에 의해 HMG-CoA reductase와 ACAT에 대한 저해활성정도를 측정하였다. 테스트용 시험물질들 중 효소반응액에 가용성인 수용성 시험물질들의 HMG-CoA reductase와 ACAT 저해활성 정도를 시험관법으로 측정하였다.

1. Microsome 분리

간 조직내의 HMG-CoA Reductase Assay를 위하여 효소원으로 microsome을 Frank H. 등 (1973) 이 실시한 분리 방법을 약간 변형 수정하여 분리하였다. 각각의 흰쥐의 간 2 g 을 0.1 M Triethanolamine, 0.02 M Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA) (pH 7.4), 2 mM Dithiothreitol 완충용액에서 homogenize후 10,000 g 와 12,000 g에서 차례로 원심분리한 상층액을 100,000 g에서 초원심분리하여 상층액을 버리고 현탁하여 세척한 후 다시 100,000 g에서 초원심분리하여 1 ml 완충액에 녹여 microsome 단백질을 정량하여 적당히 나누어 액체질소에 보관하였다가 필요시마다 녹여 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 방법을 이용하였다.

2. HMG-CoA Reductase Assay 방법

본 실험에서 실시한 방법은 Shapiro 등 (1974)이 실시한 방법을 수정 보완하여 실시하였다. 본 실험을 실시하기 전 효소원의 양, 기질의 양, cofactor의 양, 그리고 반응 시간에 따른 활성도의 변화 추이를 분석하였다. HMG-CoA reductase의 활성 측정은 microsome과 NADPH를 같이 반응시킬 때의 전반응 (preincubation) 시간과 본 반응 (incubation) 그리고, microsome 단백질의 농도에 대한 의존성 (dependence)이 매우 높았다. NADPH를 포함한 반응은 전반응시키지 않았을 때 활성도가 높으며, 반응 시간은 짧을수록 활성도에 미치는 영향이 적어서 기존의 분광광도법으로 실시할 때보다 짧은 5 - 15분으로 실시하며, microsome 단백질은 1 mg이하에서, 특히 300 μ g이하에서, 그리고, cofactor의 양은 1 - 2 mM 일 때가 최적 반응조건으로 나타났다.

Microsome 100 μg - 300 μg , NADPH 500 nmole 그리고 [^{14}C] HMG-CoA 50 nmole (1,200 cpm or 2,400 cpm/nmole specific activity)을 혼합하여 전체 반응 양을 60 μl 로 하여 37°C 항온 수조에서 15분간 반응후 1/5 volume (15 μl) 6 N HCl을 혼합한 후 30분간 37°C 항온 수조에서 반응시킴으로써 반응을 종결시켰다. 이때 생성된 mevalonate는 lactone form으로 전환되며, Silica Gel 60F254 TLC plate에 점적하여 mevalonate standard (lactone form)와 비교시 Rf 값이 0.2 부근의 band를 잘라 Scintillation counting 하였다. 활성도는 1분 반응당 microsome 단백질이 1 mg이 생성하는 mevalonate의 양을 pmole로 나타내었다 (pmoles mevalonate formed/min incubation time/mg microsomal proteins).

3. HMG-CoA Reductase 활성저해도 측정법

앞서 설명한 방법 (Shapiro et al., 1974)을 약간 변형하여 실시하였다. NADPH 500 nmole, inhibitor source 각 0, 1, 10, 50, 100 μg 과 완충용액을 첨가하여 37°C에서 5분간 전반응후 HMG-CoA 50 nmole을 더하여 37°C에서 15분간 반응시킨후 1/6 volume 6 N HCl을 첨가하여 37°C에서 15분이상 반응후 원심분리하여 상등액 15 -20 μl 를 Silica Gel 60F₂₅₄ TLC plate에 점적하여 Rf값이 0.2 부근의 band를 잘라 Scintillation counting 하여 1 mg microsomal 단백질이 1분간 생성한 mevalonate pmole수 (pmoles mevalonate formed/min/mg microsomal protein)로 활성도를 측정하였다.

4. ACAT 활성도 측정

가. ACAT Assay 완충용액 및 기질의 준비

Erickson et. al과 Gillies 등 (1986)의 방법을 수정, 보완하여 본 실험에 적용하였다. ACAT assay에 사용될 cholesterol 용액은 Triton WR-1339에 녹여 준비하였다. Cholesterol 6 mg을 6 ml acetone에 녹인 후 6 ml의 acetone에 Triton WR-1339 600 mg을 녹인 용액과 잘 섞은 후 N₂ gas 밑에서 acetone을 모두 휘발시킨 다음 20 ml의 물에 녹여 Cholesterol (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)용액을 준비하였다. 기질로 쓰이게 되는 Oleoyl-CoA는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되게 물에 녹여 적당히 나누어 deep freezer에 보관하여 필요시마다 꺼내어 사용하였다.

나. ACAT Assay

Triton WR-1339에 녹인 cholesterol 6 μg (20 μl), 1 M K-phosphate (pH 7.4), 0.6 mM BSA 5 μl 와 50~100 μg microsome을 잘 섞은 후 물로 180 μl 가 되게 채운후 37°C에서 30분간 전반응 시킨다. 5.62 nmole [^{14}C]Oleoyl-CoA (specific activity: 15,000 cpm/nmole)를 섞어 전체 volume이 200 μl 가 되게 한후 37°C에서 30분간 반응한 후 500 μl 의 Isopropanol:Heptane=4:1 용액, 300 μl 의 heptane 그리고 200 μl 의 0.1 M K-phosphate (pH 7.4)를 넣고 잘 섞은후 실온에서 2분간 방치한다. 상등액중 200 μl 를 취하여 Scintillation counting하여 나온 값을 2배(보정 인자)로 곱하여 활성도를 측정한다. 활성도의 계산은 HMG-CoA reductase의 활성도와 비슷하게 1 mg의 microsome 단백질이 1분간 생성해 내는 Cholesteryl Oleoate의 pmole수 (pmoles Cholesteryl Oleoate formed/min/mg microsomal protein)로 나타낸다 (Gillies et al., 1986).

다. ACAT Inhibition Assay

Gillies 등 (1986)이 실시한 방법을 약간 수정하여 실시하였다. Enzyme inhibitor source를 각각 0, 1, 10, 50, 100, 200, 500 μg 섞어서 전체 volume이 180 μl 가 되게 한후 전반응을 실시하였으며, 나머지 과정은 ACAT assay 방법과 동일하다. ACAT 활성 저해도는 역시 1 mg의 microsome 단백질이 1분간 생성하는 cholesteryl oleoate의 양을 pmole수 (pmole Cholesteryl Oleoate formed/min/mg microsomal protein)로 나타내었다.

제 3 절 High cholesterol diet를 급여한 흰쥐를 대상으로한 굽피추출물과 그 구성성분에 대한 *in vivo* 역가실험 (동물실험 II)

실제 콜레스테롤대사가 진행되는 *in vivo* system을 도입하여 고지혈증 및 동맥경

화 유도성 식이사료(diet)에, 시험물질들을 혼합하여 투여함으로써 생체내에서의 콜레스테롤 저하효능을 직접적인 방법으로 관찰하였다. 이 실험에 사용된 시료분석 방법들 중 간의 콜레스테롤 대사에 관여하는 두 가지 효소, 즉 HMG-CoA reductase와 ACAT 활성도 및 타시료분석에 사용된 방법은 다음과 같이 실시하였다. 굴피 추출물과 그 추출성분인 hesperidin, naringin, hesperitin, naringenin을 식이의 0.1%(wt/wt) 수준으로 사료에 혼합하여 동물사육을 한 다음 혈장지질 수준, 콜레스테롤 대사에 관여하는 hepatic enzyme 활성, 간의 조직형태 그리고 fecal sterol 배설양들을 비교, 분석하였다. 분석결과는 평균과 표준오차로 나타냈으며 식이군간 비교 분석에는 one way-ANOVA를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 그 유의성을 검증하였다.

1. 동물 실험디자인 및 식이조성

콜레스테롤 저하 효능 테스트에 사용되는 시험 물질로는 Hesperidine, Naringin, Hesperitine, Naringenin, 감귤피 추출물이며 그 결과는 대조군과 비교하였다.

동물실험 I의 연구결과에서 탁월한 혈중 콜레스테롤 강하 효과를 보이는 것으로 확인된 감귤피 추출물의 효능을 좀더 체계적으로 조사하고 재확인하기 위해 Fig. 3와 같은 동물실험을 디자인하였다. 건강한 수컷 흰쥐 (Sprague Dawley, 3주령)를 대한실험동물센터(충북, 음성군)으로부터 구입하여 Lab-chow 식이를 제공하면서 1주간 안정시킨 후 무작위로 7 그룹으로 나눈 후 Table 2와 같이 1% 콜레스테롤 및 시험물질이 식이의 0.1% 수준으로(단 감귤피 추출물은 16.7%로 하였는데 이는 hesperidine 0.1%와 동량에 해당함) 혼합된 식이를 5주간 급여하였다. 동물들은 항온 (20 °C) 과 항습 (50 %) 그리고 7:00시부터 19:00 시까지의 light cycle을 유지하는 동물실험실에 설치된 개개의 stainless cage 안에서 사육하였으며 모든 식이와 식수들은 자유식(ad libitum)으로 먹게 하였다. 사육기간 중 마지막 3일 동안은 분변을 수집하여 건조시켰으며, 체중은 5일 마다 측정하였고 식이섭취량은 사육기간 중 매일 측정하여 기록되었다. 동물들은 15 시간 절식 후 Ketamine-HCl (유한양행) 마취제를 근육주사 (75 mg/kg 체중) 하여 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취하였으며 장기조직들을 수집하였다. 혈장은 혈장지질 측정용으로 사용되었고, 간 조직은 형태학적 분석, 조직지질 및 간 조직 효소 (HMG-CoA reductase 및 ACAT의 활성도 측정)에 사용되었다.

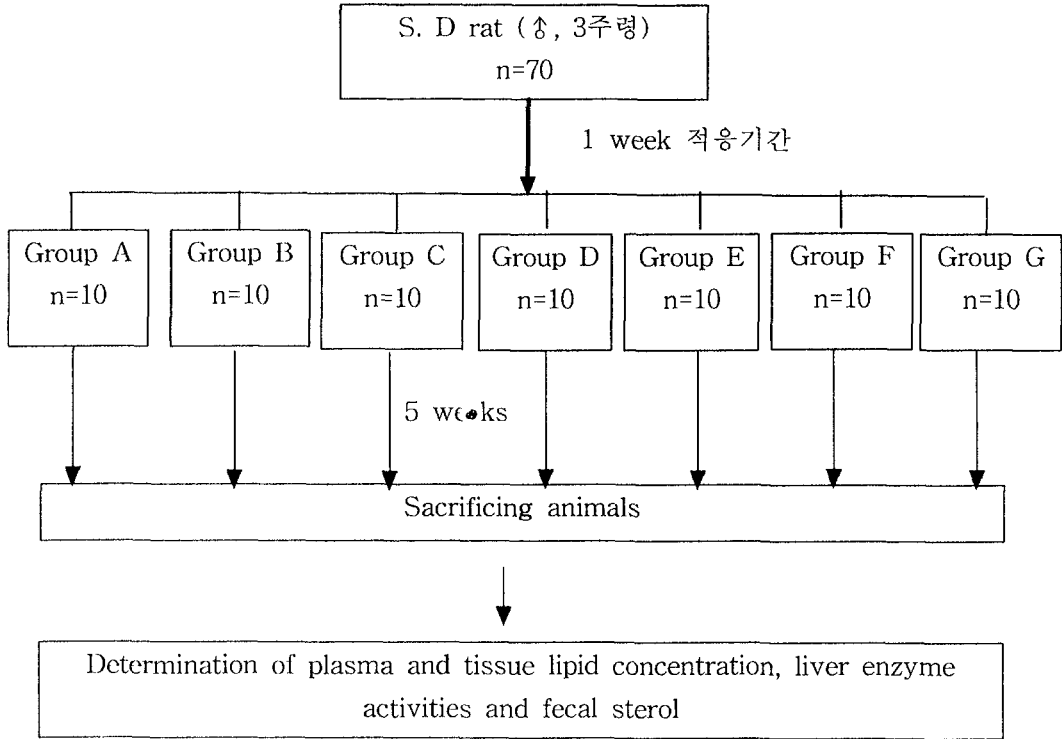


Fig. 3. Experimental design of animal study II.

2. 시료분석 방법

구체적인 방법은 부록 참조

- (1) 총 cholesterol의 정량
- (2) HDL cholesterol의 정량
- (3) 중성지질의 정량
- (4) 간조직의 GOT·GPT 측정을 통한 독성 측정
- (5) 조직의 지질 함량 측정
- (6) HMG-CoA reductase 활성도 측정
- (7) ACAT 활성도 측정
- (8) 분변 스테롤 측정

Table 2. Diet composition of for the *in vivo* experiment (unit: % of diet)

Group Component	A (Control) n=10	B (Hesperidin) n=10	C (Naringin) n=10	D (Combination :B&C) n=10	E (Hesperetin) n=10	F (Naringenin) n=10	G (귤피) n=10
Casein	20	20	20	20	20	20	20
D,L - methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	15	15	15	15	15	15	15
Sucrose	49	48.9	48.9	48.9	48.9	48.9	32.3
Cellulose powder	5	5	5	5	5	5	5
Mineral mixture ¹	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ²	1	1	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil	5	5	5	5	5	5	5
Cholesterol	1	1	1	1	1	1	1
Hesperidin		0.1		0.05			
Naringin			0.1	0.05			
Hesperitin					0.1		
Naringenin						0.1	
귤피							16.7
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100

¹ AIN-76 mineral mixture

² AIN-76A vitamin mixture AIN vitamin mixture 76-A contained (in g/kg mixture): thiamin HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; pyridoxine HCl, 0.7; nicotinic acid, 0.003; D-calcium pantothenate, 0.0016; folate, 0.2; D-biotin, 0.02; cyanocobalamin (vitamin B-12), 0.001; retinyl palmitate premix, 0.8; DL-alpha tocopheryl acetate, premix, 20; cholecalciferol (vitamin D₃), 0.0025; menaquinone (vitamin K), 0.05; antioxidant, 0.01; sucrose, finely powdered, 972.8.

3. 통계처리

본 실험에서 나온 모든 결과는 컴퓨터 통계 프로그램중의 하나인 SPSS package program을 이용하여 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 ANOVA를 이용하여 처리하였으며, 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 P < 0.05 이상의 수준에서 검정하였으며 그 결과를 standard deviation과 함께 표시하여 나타내었다

(Steel and Torrie, 1960).

제 4 절 High cholesterol 과 high fat diet를 동시 급여한 흰쥐를 대상으로 굴피추출물과 그 구성성분에 대한 *in vivo* 역가 실험(동물실험 III)

전단계 동물실험 I의 결과에서 콜레스테롤 저하효능이 제일 우수한 굴피 추출물 성분 중의 한가지와 현재 시판되는 콜레스테롤 강하제(lovastatin)를 각각 low dose(0.02% of diet, 20 mg/kg body wt)와 high dose(0.05% of diet, 60 mg/kg body wt)로 사료에 혼합하여, 동맥경화성 식이와 함께 급여하여 사육하였다. 본 동물실험에서 시험물질의 투여용량은 동물실험 3의 20% - 50%수준으로 하였는데 그 이유는 동맥경화성 식이의 급여시, naringin이 효능을 나타낼 수 있는 최저용량을 찾으려는 목적에서 의도적으로 투여용량을 감소시켰다.

사육종료후 혈장지질 수준, 콜레스테롤 대사에 관여하는 hepatic enzyme 활성, 간의 조직형태 그리고 fecal sterol 배설양들을 비교, 분석하였다. 분석결과는 평균과 표준오차로 나타냈으며 식이군간 비교 분석에는 one way-ANOVA를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

1. 동물실험 디자인 및 식이 조성

동물실험의 효능 테스트에 사용되는 시험 물질로는 앞서 실시한 동물실험 II에서 그 효능이 제일 우수한 naringin을 사용하였고 그 결과를 대조물질인 Lovastatin과 비교하였다.

동물실험 II에서 혈중 콜레스테롤 농도 강하 효과를 보이는 것으로 확인된 Naringin의 효능을 좀더 체계적으로 조사하고 재확인하기 위해 Fig. 4와 같은 동물실험을 디자인하였다. 건강한 수컷 흰쥐 60마리(Sprague Dawley, 3주령)를 대한실험동물센터(충북, 음성군)으로부터 구입하여 Lab-chow 식이를 제공하면서 1주간 안정시킨 후 무작위로 6 그룹으로 나눈 후 Table 4 및 5과 같이 1% 콜레스테롤, 15% 라아드, 및 시험물질이 혼합된 식이를 5주간 급여하였다. 이 실험에서는 앞서 실시한 동물실험의

결과분석에서 콜레스테롤 저하효능이 제일 우수한 감글피 추출물 성분 중의 한가지와 현재 시판되는 콜레스테롤 강하제(lovastatin)를 각각 low dose(0.02% of diet, 20 mg/kg body wt)와 high dose(0.05% of diet, 60 mg/kg body wt)로 사료에 혼합하여, 동맥경화성 식이와 함께 급여하여 사육하였다. 동물실험 2에서 시험물질의 투여수준은 동물실험 1에서 투여된 용량의 20% 또는 50%수준으로 하였는데 그 이유는 동맥경화성 식이의 급여시, naringin이 효능을 나타낼 수 있는 최저용량을 찾으려는 시도에 서 그 투여용량을 감소시켰다.

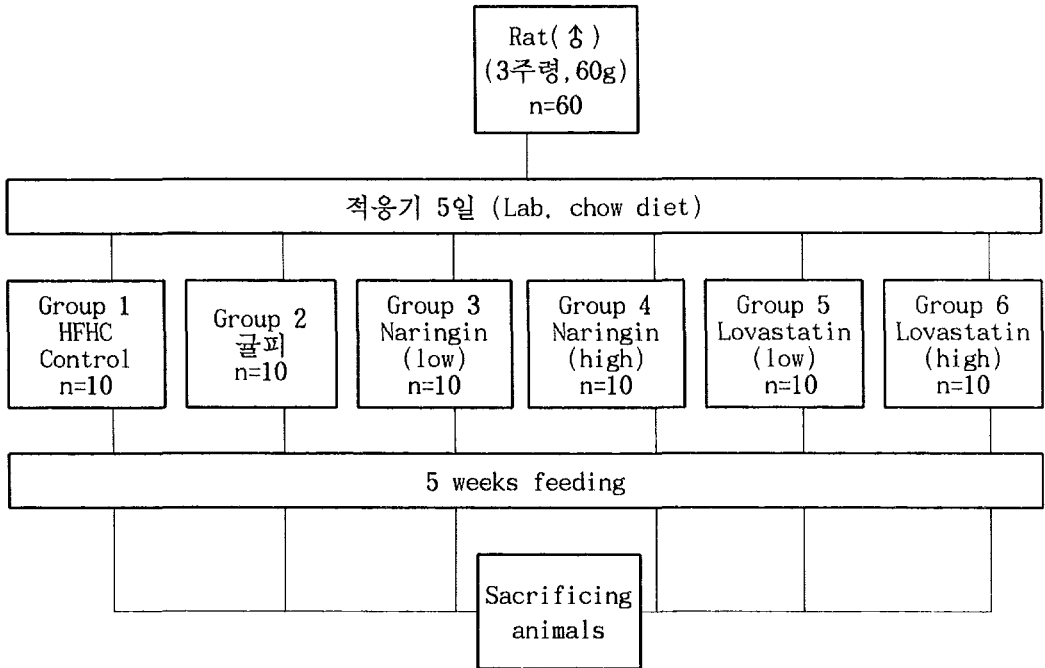


Fig. 4. Experimental design of animal study III.

Table 4. Classification of dietary groups for animal study III

Dietary Groups	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
		HFHC Control	감글피	Naringin (low)	Naringin (high)	Lovastatin (low)
Composition	15% Fat + 1% Cholesterol	HFHC + 16.5% 감글피	HFHC + 0.02% Naringin	HFHC + 0.05% Naringin	HFHC + 0.02% Lovastatin	HFHC + 0.05% Lovastatin

동물들은 항온 (20 °C) 과 항습 (50 %) 그리고 7:00시 부터 19:00 시까지의 light cycle을 유지하는 동물실험실에 설치된 개개의 stainless cage 안에서 사육하였으며 모든 식이와 식수들은 자유식 (*ad libitum*)으로 먹게 하였다. 사육기간 중 마지막 3 일 동안은 분변을 수집하여 건조시켰으며, 체중은 5일 마다 측정하였고 식이섭취량은 사육기간 중 매일 측정하여 기록되었다. 동물들은 15 시간 절식 후 Ketamine-HCl (유한양행) 마취제를 근육주사 (75 mg/kg 체중)하여 복부 하대 정맥으로부터 혈액을 채취하였으며 장기조직들을 수집하였다. 혈장은 혈장지질 측정용으로 사용되었고, 간 은 조직지질 및 간 조직 효소 (HMG-CoA reductase 및 ACAT)의 활성화 측정용에 사용되었다.

Table 5. Diet composition for animal experiment III

	Group 1 HFHC Control	Group 2 굴피	Group 3 Naringin (low)	Group 4 Naringin (high)	Group 5 Lovastatin (low)	Group 6 Lovastatin (high)
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
D,L-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Sucrose	39.0	22.5	38.98	38.95	38.98	38.95
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Fat (lard)	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Cholesterol	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
굴피		16.5*				
Naringin			0.02**	0.05***		
Lovastatin					0.02**	0.05***
Total	100	100	100	100	100	100

HFHC: high-fat & high cholesterol

* 0.1% Hesperidine & 0.005% Naringin equivalent

** 20 mg/Kg B.W. (Body weight) dose per day(사육기간 6주동안 평균체중을 210g 기준)

*** 60 mg/Kg B.W. dose per day (사육기간 6주동안 평균체중을 210g 기준으로함)

2. 시료분석 방법

부록 참조

제 5 절 대추추출물의 효능 및 naringin과 병합투여 효능확인을 위한 동물실험(동물실험 IV)

High cholesterol diet와 생명공학연구소 복성해 박사 실험실로부터 제공받은 시험물질들을 급여한 흰쥐를 사용하여 감귤피 엑기스, 대추엑기스, 감귤피분말, 대추분말 및 이들의 병합투여효과에 대한 *in vivo* 역가를 측정하였다. 실험식은 기본적으로 2% 대추 엑기스가 포함되었고 (단, 1개 group은 제외) 병합투여된 성분(Table 6)으로는 감귤피 엑기스, 대추엑기스, 감귤피분말, 대추분말, naringin을 사용하였다. 단, 마늘분말, 생강분말, 양파분말은 기능성 성분인 naringin과 함께 혼합하여 투여함으로써 기능성 소오스 재료개발에 대한 자료로 이용된다. 즉 시험물질들을 Table 7과 같이 고콜레스테롤식에 혼합하여 동물사육을 한 후 혈장지질 수준을 비교, 분석하였다. 분석결과는 평균과 표준오차로 나타냈으며 식이군간 비교분석에는 one way-ANOVA를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 그 유의성을 검증하였다.

1. 동물 실험디자인 및 식이조성

동물실험의 콜레스테롤 저하 효능 테스트에 사용되는 주요 시험 물질로는 naringin, 감귤피 엑기스, 감귤피분말, 대추 엑기스, 대추분말로 대조군과 비교되었다. 2차년도 연구결과에서 탁월한 혈중 콜레스테롤 강하 효과를 보이는 것으로 확인된 감귤피 추출물의 효능을 좀더 체계적으로 조사하고 대추엑기스와의 병합투여 효능을 확인 하기 위해 Fig. 5과 같이 동물실험을 디자인하였다. 건강한 수컷 흰쥐 (Sprague Dawley, 3주령)를 대한실험동물센터(충북, 음성군)으로부터 구입하여 Lab-chow 식이를 제공하면서 1주간 안정시킨 후 무작위로 6 그룹으로 나눈 후 Table 6과 같이 1% 콜레스테롤 및 시험물질을 식이의 일정비율로 혼합된 식이를 6주간 급여하였다. 식이에 혼합된 시험물질들의 일반성분 분석은 한국식품개발연구원에 의뢰하여 분석되었으며 그 결과는 Table 7 와 같다. 대추엑기스는 물추출물 농축액이며

감귤피 엑기스는 ethanol 추출물 농축액에 해당한다. 동물들은 항온 (20 °C) 과 항습 (50 %) 그리고 7:00시부터 19:00 시까지의 light cycle을 유지하는 동물실험실에 설치된 개개의 stainless cage 안에서 사육하였으며 모든 식이와 식수들은 자유식 (*ad libitum*)으로 먹게 하였다. 사육기간 중 마지막 3일 동안은 분변을 수집하여 건조시켰으며, 체중은 5일 마다 측정하였고 식이 섭취량은 사육기간 중 매일 측정하여 기록되었다. 동물들은 15 시간 절식 후 Ketamine-HCl (유한양행) 마취제를 근육주사 (75 mg/kg 체중) 하여 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취하였으며 장기조직들을 수집하였다. 혈장은 혈장지질 측정용으로 사용되었고, 간 조직은 형태학적 분석, 조직지질 및 간 조직 효소 (HMG-CoA reductase 및 ACAT의 활성화 측정)에 사용된다.

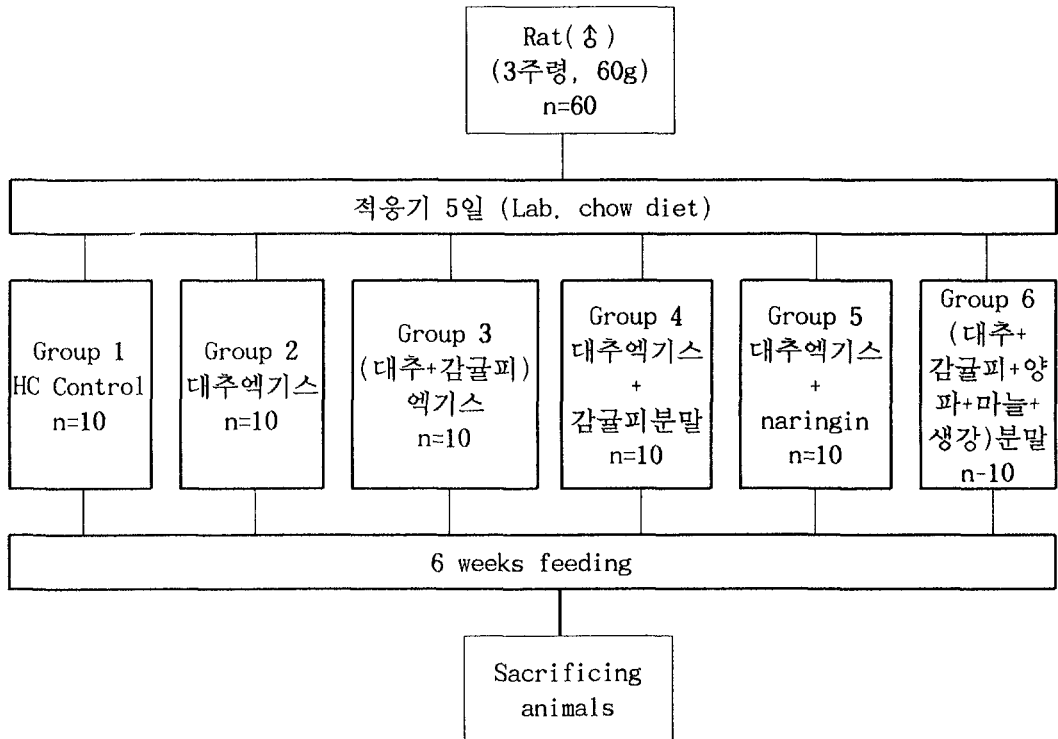


Fig. 5. Experimental design of animal study V.

Table 6. General compositions of test materials (%)

시험물질		대추 엑기스	감귤피 엑기스	대추분말	감귤피 분말	양파분말	생강분말	마늘분말
지방		1.7	0.2	1.7	1.03	2.65	4.37	1.27
단백질		2.9	2.4	2.9	4.98	12.58	12.01	7.59
탄수화물	과당	16.1	8.5	57.9	91.09	78.11	67.7	85.83
	포도당	15.1	7.6					
	설탕	14.5	7.1					
회분		1.5	2.4	1.5	2.9	4.63	5.46	3.29
섬유소		6.1	-	6.1	-	1.99	10.37	2.02
수분함량		42.1	71.8	29.5	0	0	0	0
Total(%)		100	100	100	100	100	100	100

2. 시료분석

부록 참조

- 1) 총 cholesterol의 정량
- 2) HDL cholesterol의 정량
- 3) 중성지질의 정량

3. 통계처리

본 실험에서 나온 모든 결과는 컴퓨터 통계 프로그램 중의 하나인 SPSS package program을 이용하여, 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 ANOVA를 이용하여 처리하였으며, 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 $P < 0.05$ 이상의 수준에서 검정하였으며 그 결과를 standard deviation과 함께 표시하여 나타내었다 (Steel and Torrie, 1960).

Table 7. Diet compositions of experimental diets used for animal study IV (%)

Group Components	HC Control	대추엑기스	(대추+ 감귤피) 엑기스	대추엑기스 + 감귤피분말	대추엑기스 + naringin	(대추+감귤피 +양파+마늘+ 생강) 분말
Casein	20	19.94	19.7	19.44	19.94	18.98
D,L - methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	15	15	15	15	15	14.46
Sucrose	49	47.25	37.74	39.55	47.81	38.94
Cellulose powder	5	4.87	4.87	4.05	4.87	4.82
Mineral mixture ¹	3.5	3.46	3.23	3.17	3.46	3.04
Vitamin mixture ²	1	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil	5	4.96	4.95	4.85	4.95	4.91
Cholesterol	1	1	1	1	1	1
대추엑기스	-	2	2	2	2	-
감귤피엑기스	-	-	10	-	-	-
감귤피분말	-	-	-	10	-	5
Naringin	-	-	-	-	0.02	-
대추분말	-	-	-	-	-	1
양파분말	-	-	-	-	-	5
생강분말	-	-	-	-	-	0.25
마늘분말	-	-	-	-	-	1
Total (%)	100	100	100	100	100	100

¹ AIN-76 mineral mixture

² AIN-76A vitamin mixture AIN vitamin mixture 76-A contained (in g/kg mixture): thiamin HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; pyridoxine HCl, 0.7; nicotinic acid, 0.003; D-calcium pantothenate, 0.0016; folate, 0.2; D-biotin, 0.02; cyanocobalamin (vitamin B-12), 0.001; retinyl palmitate premix, 0.8; DL-alpha tocopheryl acetate, premix, 20; cholecalciferol (vitamin D₃), 0.0025; menaquinone (vitamin K), 0.05; antioxidant, 0.01; sucrose, finely powdered, 972.8.

제 6 절 Citrus bioflavonoid와 인삼이 vitamin E 수준이 식 이에 보충된 경우 고지혈증 예방효과에 미치는 영향 분석 (동물실험 V)

High cholesterol diet와 생명공학연구소 복성해 박사 실험실로부터 제공받은 시험물질들(naringin, hesperidin, 인삼분말)을 대상으로 항산화영양소 vitamin E 수준을 달리한 고콜레스테롤 식이를 흰쥐에 급여함으로써, 이들 시험물질의 항산화능을 통한 지질대사 개선여부를 시험하였다.

실험식은 기본적으로 1% 콜레스테롤이 포함되어있고 병합투여된 항산화기능을 지닌 naringin, hesperidin 및 인삼분말을 보충하였다. 실험동물 중 흰쥐는 체내에서 vitamin C 합성이 가능하므로 항산화영양소인 vitamin E의 보충 수준만 달리하였다. 일반적으로 흰쥐의 표준실험 식이에 포함된 vitamin E의 수준은 최소 필요량의 20배이며, 본 실험에서는 vitamin E 수준을 결핍증세가 나타나지 않는 최저 수준(27 IU/kg diet 또는 0.67 mg of RRR--tocopherol)과 이 양의 20배를 정상수준(540 IU/kg diet)으로 하여 실험식을 제조하였다. 즉 시험물질들과 vitamin E 수준을 Table 8과 같이 고콜레스테롤 식이에 혼합하여 동물사육을 한 후 혈장지질 수준을 비교, 분석하였다. 분석결과는 평균과 표준오차로 나타냈으며 식이군간 비교분석에는 one way-ANOVA를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 그 유의성을 검증하였다.

1. 동물 실험디자인 및 식이조성

동물실험은 Fig. 6과 같이 디자인하였다. 건강한 수컷 흰쥐 (Sprague Dawley, 3주령)를 대한실험동물센터(충북, 음성군)으로부터 구입하여 Lab-chow 식이를 제공하면서 1주간 안정시켜 무작위로 6 그룹으로 나눈 후 Table 8과 같이 1% 콜레스테롤 및 시험물질(0.1% of naringin, hesperidin, or ginseng)을 식이의 일정비율로 혼합된 식이를 6주간 급여 하였다. 식이는 1주일 단위로 신선한 상태로 조제하여 공급하였다.

동물들은 항온 (20 °C) 과 항습 (50 %) 그리고 7:00시부터 19:00 시까지의 light cycle을 유지하는 동물실험실에 설치된 개개의 stainless cage 안에서 사육하였으며

모든 식이와 식수들은 자유식 (*ad libitum*)으로 먹게 하였다. 사육기간 중 마지막 3 일 동안은 분변을 수집하여 건조시켰으며, 체중은 5일 마다 측정하였고 식이 섭취량은 사육기간 중 매일 측정하여 기록되었다. 동물들은 15 시간 절식 후 Ketamine-HCl (유한양행) 마취제를 근육주사 (75 mg/kg 체중) 하여 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취하였으며 장기조직들을 수집하였다. 혈장은 혈장지질 측정용으로 사용되었고, 간 조직은 형태학적 분석, 조직지질 및 간 조직 효소 (HMG-CoA reductase 및 ACAT의 활성도 측정에 사용된다.

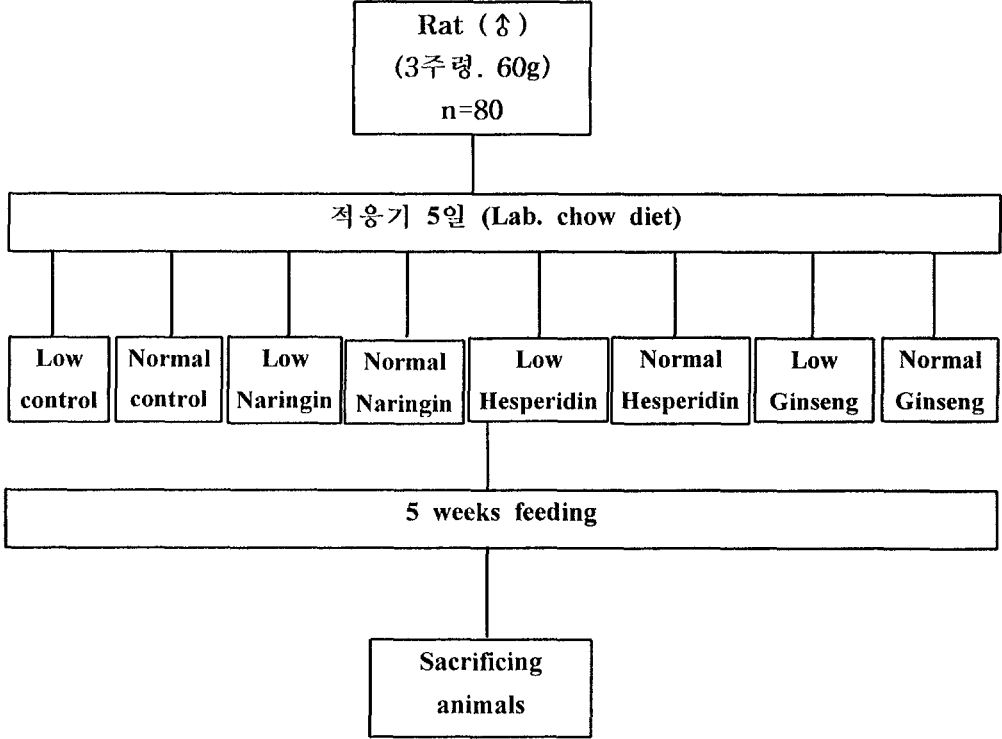


Fig. 6. Experimental design of the second *in vivo* study Low and normal mean marginal level vit. E and normal level vit. E in diet respectively.

Table 8. Diet compositions(%) of experimental diets used for animal study V

Group Components	Low Control	Normal Control	Low Naringin	Normal Naringin	Low Hesperidin	Normal Hesperidin	Low Ginseng	Normal Ginseng
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
Casein	20	20	20	20	20	20	20	20
D,L-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	15	15	15	15	15	15	15	15
Sucrose	49	49	48.9	48.9	48.9	48.9	48.9	48.9
Cellulose powder	5	5	5	5	5	5	5	5
Mineral mixture ¹	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ²	-	1	-	1	-	1	-	1
Vitamin mixture ³	1	-	1	-	1	-	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Corn oil	5	5	5	5	5	5	5	5
Cholesterol	1	1	1	1	1	1	1	1
naringin	-	-	0.1	0.1	-	-	-	-
hesperidin	-	-	-	-	0.1	0.1	-	-
Ginseng powder	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100	100

¹ AIN-76 mineral mixture

² AIN-76A vitamin mixture. AIN vitamin mixture 76-A contained (in g/kg mixture): thiamin HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; pyridoxine HCl, 0.7; nicotinic acid, 0.003; D-calcium pantothenate, 0.0016; folate, 0.2; D-biotin, 0.02; cyanocobalamin (vitamin B-12), 0.001; retinyl palmitate premix, 0.8; DL-alpha tocopheryl acetate, premix, 20; cholecalciferol (vitamin D₃), 0.0025; menaquinone (vitamin K), 0.05; antioxidant, 0.01; sucrose, finely powdered, 972.8.

³ AIN-76A vitamin mixture with marginal level of vitamin E. (DL-alpha tocopheryl acetate, premix, 1g/kg vitamin mixture)

Low and normal mean marginal level vit. E and normal level vit. E in diet respectively.

2. 시료분석

구체적인 방법은 부록에 서술되었음.

- 1) 총 cholesterol의 정량
- 2) HDL cholesterol의 정량
- 3) 중성지질의 정량
- 4) 간장조직의 지질 정량
- 5) Hepatic HMG-CoA reductase activity
- 6) Hepatic ACAT activity
- 7) 간조직의 형태학적 분석
- 8) 조직의 항산화효소 활성화도 측정
- 9) 분변 스테롤 분석

3. 통계처리

본 실험에서 나온 모든 결과는 컴퓨터 통계 프로그램중의 하나인 SPSS package program을 이용하여 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 ANOVA를 이용하여 처리하였으며, 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 $P < 0.05$ 이상의 수준에서 검정하였으며 그 결과를 standard deviation 또는 standard error와 함께 나타내었다 (Steel and Torrie, 1960).

제 7 절 Cinnamate derivatives와 타 bioflavonoid들(rutin, quercetin dihydrate, gallate, tannin)의 혈중 콜레스테롤 강하기능 (동물실험 VI)

최종 연구년도인 4차년도에는 생명공학 연구소에서 수행한 예비실험을 통해 후보 물질로 선정된 cinnamate derivatives (4-hydroxy cinnamate, 3,4-dihydroxy cinnamate, 3,4-dihydroxy hydrocinnamate, cinnamate)와 타 bioflavonoid들 (rutin,

quercetin dihydrate, gallic acid, tannin)의 혈중 콜레스테롤 강하기능을 시험하며, 동물 모델을 통해 이들 기능성물질의 *in vivo* 작용기작을 규명하는 실험을 실시하였다.

구체적으로는 첫째, 실험동물을 대상으로 고콜레스테롤(1%) 식이에 0.1% 수준의 bioflavonoid를 보충하여 이들 동물의 전반적인 지질대사 변화와 항산화계에 미치는 영향을 비교, 분석하였다. 둘째, 이들 bioflavonoid의 보충이 혈장, 조직 및 분변의 지질함량과 관련 효소의 활성변화에 미치는 효과를 분석하였다. 최종적으로는 cinnamate와 타 bioflavonoid의 *in vivo* efficacy test를 통해 이 물질의 기능성을 이용한 건강 보조제 또는 약제 개발에 대한 추진 가능성을 분석하였다.

1. 식이 제조 및 동물사육실험

콜레스테롤을 저하시키는 기능이 있다고 가정되는 cinnamate를 동물(흰쥐)실험을 통한 *in vivo* system에 적용하였다. 즉, 동맥경화 유도성 식이(diet)에 시험물질을 혼합하여 투여함으로써 이들의 콜레스테롤 저하효능을 현재 시판되는 혈중 콜레스테롤저하 약제중의 하나인 lovastatin의 효능과 비교, 관찰하였다. 동물식이의 제조과정은 앞서 기술된 방법에 준하며 table 9과 같이 제조하였다.

2. 각종시료의 분석 방법

구체적인 방법은 부록에 서술되었음.

- 1) 총 cholesterol의 정량
- 2) HDL cholesterol의 정량
- 3) 중성지질의 정량
- 4) Microsome 분리
- 5) HMG-CoA Reductase Assay 방법
- 6) ACAT Assay

3. 통계처리

본 실험에서 나온 모든 결과는 컴퓨터 통계 프로그램중의 하나인 SPSS package

program을 이용하여 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 ANOVA를 이용하여 처리하였으며, 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 $P < 0.05$ 이상의 수준에서 검정하였으며 그 결과를 standard error과 함께 표시하여 나타내었다 (Steel and Torrie, 1960).

Table 9. Compositions of experimental diets for animal study VI.

Dietary components \ Groups	Control (n=10)	Test (n=10)
Casein	20	20
D,L - methionine	0.3	0.3
Corn starch	15	15
Sucrose	49	48.9
Cellulose powder	5	5
Mineral mixture	3.5	3.5
Vitamin mixture	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2
Corn oil	5	5
Cholesterol	1	1
Test components¹		0.1
Total (%)	100	100

¹Cinnamate derivatives (4-hydroxy cinnamate, 3,4-dihydroxy cinnamate, 3,4-dihydroxy hydrocinnamate, cinnamate)와 타 bioflavonoid 화합물 (rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, tannin)

여 백

제 3 장 연구 결과

제 1 절 흰쥐를 이용한 추출물의 *in vivo* 역가 실험

1. 대추추출물과 감귤피추출물의 *in vivo* 효능

- Test substances : ① 대추추출물 (분말)
② 감귤피 (액체) 추출액
③ Hesperidin (pure 분말)

가. 혈장 지질 농도에 미치는 영향

혈장 지질 농도는 Table 10에서와 같이 total cholesterol 농도는 G-4군이 나머지군들에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며 HDL-cholesterol 농도는 그룹간 아무런 차이가 없었다. 대추추출 분말과 오렌지 진피 추출액이 혼합된 식이를 급여한 G-2와 G-3군은 total cholesterol 농도가 control군보다 낮은 경향이었으나 유의적 차이는 없었다. Total cholesterol에 대한 HDL-cholesterol 농도비는 total cholesterol 농도와 같이 G-4군만이 유의적으로 낮았다. 그러므로 hesperidin을 급여한 G-4군이 혈장 콜레스테롤 농도 감소에 가장 크게 기여하였다.

혈장 중성지질 농도 비교에서는 실험군 모두가 대조군보다 유의적으로 낮게 나타나 대추추출분말, 오렌지 진피 추출액 그리고 hesperidin 모두가 중성지질 저하 효과를 가지는 것으로 나타났다.

감귤피 추출물과 hesperidin의 투여가 간의 콜레스테롤 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 간조직의 콜레스테롤 합성을 조절하는 효소인 HMG-CoA reductase의 활성을 측정하였다. 다음 표 3에서 보듯이 이효소의 활성도는 G-3와 G-4 군이 대조군인 G-1군보다 유의적으로 낮았다. 그러므로 감귤피 추출액과 hesperidin의 투여가 간조직에서의 콜레스테롤 합성을 저해 또는 감소시키는 것으로 사료된다.

Table 10. Plasma lipid concentrations of rats fed control and experimental diet.

Dietary groups	Plasma lipids			
	Total-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	HDL-C/Total-C (%)	Triglyceride (mg/dl)
G-1	141.6±18.1 ^a	31.1±2.4 ^a	21.9 ^a	96.0±6.9 ^a
G-2	103.3±15.9 ^{ab}	25.4±1.2 ^a	24.5 ^{ab}	61.3±6.5 ^b
G-3	101.6±12.8 ^{ab}	29.2±1.4 ^a	28.7 ^{ab}	55.5±3.9 ^b
G-4	64.6±6.1 ^b	26.7±2.2 ^a	41.3 ^b	61.8±7.9 ^b

나. HMG-CoA reductase 활성도에 미치는 영향

Table 10. 진피추출액과 hesperidine의 투여가 간조직의 HMG-CoA reductase 활성도에 미치는 영향. (평균±S.D)

식이군	HMG-CoA reductase 활성도 (nmoles of CoA-SH formed/min/mg of protein)
G-1 (대조군)	347 ± 21.5 ^a
G-3 (감귤피 추출액)	296 ± 11.6 ^b
G-4 (hesperidin 투여)	142 ± 9.7 ^c

2. 감귤피 추출액과 hesperidin의 in vitro에서의 HMG-CoA reductase저해 활성

흰쥐를 이용한 동물실험에서 HMG-CoA reductase저해 활성을 보인 감귤피 추출액이 시험관 내에서도 같은 효소에 대한 저해 역가를 나타내는지를 조사하기 위해 HMG-CoA reductase 효소원으로 흰쥐 간 조직의 microsomal protein (0.8 mg)을 사용하고 저해 제원으로 감귤피 추출액과 hesperidin을 여러 가지 농도로 사용하여 HMG-CoA reductase assay system에 도입하였다. 그 결과 아래 Fig. 7에서 보는 바와 같이 1.64 µg의 감귤피 추출액이 이 1ml의 반응물에 첨가된 조건에서 대조군에 비해 35%의 저해활성을 보이며, 16.4 µg이 첨가된 같은 조건에서 65%의 저해활성을 보임을 알 수 있었다.

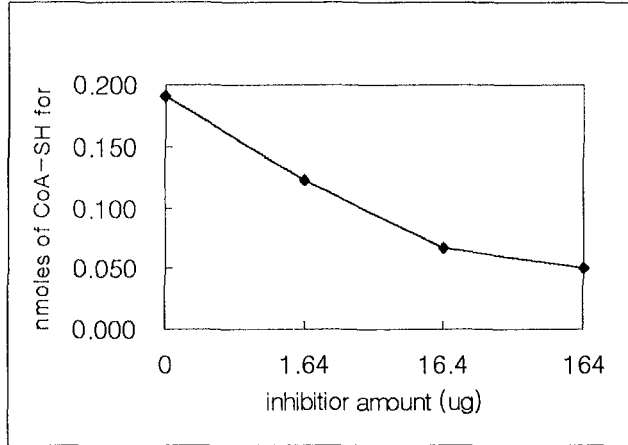


Fig. 7. 감글피 추출액의 HMG-CoA reductase저해 활성

아래의 Fig. 8에서 Hesperidin과 감글피추출액의 비교실험에서 보는 바와 같이 감글피 추출액이 같은 양의 hesperidin 보다 더욱 우수한 저해 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

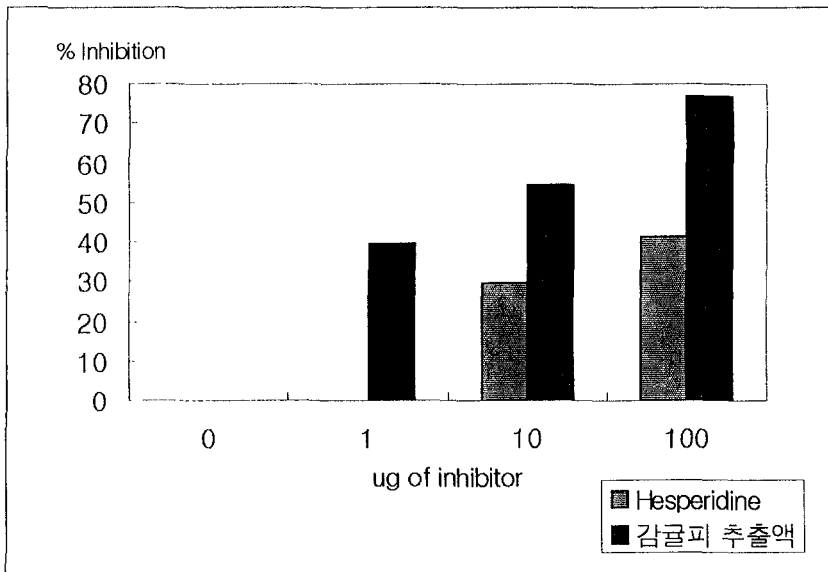


Fig. 8. 감글피 추출액과 hesperidin의 *in vitro*에서의 HMG-CoA reductase 저해 활성.

제 2 절 *In vitro*에서 HMG-CoA reductase와 ACAT 활성저해 물질의 탐색

탐색 대상물질로서 시험물질은 Naringin, 감귤피 추출물, Naringenin을 사용하였고 대조물질로는 수용성 물질인 Pravastatin을 사용하여 hepatic enzyme인 HMG-CoA reductase와 ACAT 저해 활성도를 측정된 결과를 Table 11~ Table 14에 걸쳐 나타내었다.

Table 11. Activity of HMG-CoA reductase inhibition by naringin

Enzyme Quantity	HMG-CoA Reductase		Enzyme Quantity	ACAT	
	Activity* (pmoles/min/mg)	Inhibition (%)		Activity** (pmoles/min/mg)	Inhibition (%)
(-) Control	987.71	0.00	(-) Control	521.43	0.00
1 μg (16.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1003.00	-1.55	1 μg (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	528.36	-1.33
10 μg (166.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	970.84	1.71	10 μg (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	526.78	-1.03
50 μg (833.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			50 μg (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	535.00	-2.60
100 μg (1666.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1099.10	-11.28	100 μg (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	532.31	-2.07
200 μg (3333.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			200 μg (1 mg/ml)		
500 μg (8333.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			500 μg (2.5 mg/ml)	547.72	-5.04

* measured the reduction of 50nmoles of [^{14}C]HMG-CoA to [^{14}C]Mevalonate in 30 min incubation with HMG-CoA after 5min preincubation without HMG-CoA with 250 μg Microsome and then conversed the unit to pmoles mevalonate fomed/min/lmg of microsomal protein. Total reaction vol.: 60 μl containing 10 μl of inhibitor source.

** mesured the conversion of 5.62nmoles of [^{14}C]Oleoyl-CoA to [^{14}C]Cholesteryl oleoate in 30min incubation with Oleoyl-CoA after 30min preincubation without Oleoyl-CoA with 250 μg Microsome and then conversed the unit to pmles Cholesteryl oleoate formed/min/lmg of microsomal protein. Total reaction vol.: 200 μl containing 20 μl of inhibitor source.

Table 12. Activity of HMG-CoA reductase inhibition by orange skin extract

Enzyme Quantity	HMG-CoA Reductase		Enzyme Quantity	ACAT	
	Activity* (pmoles/min/mg)	Inhibition (%)		Activity** (pmoles/min/mg)	Inhibition (%)
(-) Control	1093.70	0.00	(-) Control	687.35	0.00
1 μg (16.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1156.23	-5.72	1 μg (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	702.58	-2.22
10 μg (166.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1095.24	-0.14	10 μg (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	680.95	0.93
50 μg (833.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			50 μg (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	695.98	-1.26
100 μg (1666.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1165.35	-6.55	100 μg (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	679.45	1.15
200 μg (3333.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1375.55	-25.77	200 μg (1 mg/ml)		
500 μg (8333.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			500 μg (2.5 mg/ml)	711.94	-3.58

*, ** same as legend on Table 11.

Table 13. Activity of HMG-CoA reductase inhibition by Naringenin

Enzyme Quantity	HMG-CoA Reductase		Enzyme Quantity	ACAT	
	Activity* (pmoles/min/mg)	Inhibition (%)		Activity** (pmoles/min/mg)	Inhibition (%)
(-) Control	2031.96	0.00	(-) Control	543.00	0.00
1 μg (16.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1872.26	7.86	1 μg (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	525.28	3.26
10 μg (166.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	2070.22	-1.88	10 μg (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	534.14	1.63
50 μg (833.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1082.91	46.71	50 μg (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	465.77	14.22
100 μg (1666.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	575.99	71.65	100 μg (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	219.11	59.65
200 μg (3333.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			200 μg (1 mg/ml)	217.03	60.03
500 μg (8333.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			500 μg (2.5 mg/ml)		

*, ** same as legend on Table 11.

Table 14. Activity of HMG-CoA reductase inhibition by Pravastatin

Enzyme Quantity	HMG-CoA Reductase		Enzyme Quantity	ACAT	
	Activity* (pmoles/min/mg)	Inhibition (%)		Activity** (pmoles/min/mg)	Inhibition (%)
(-) Control	1026.68	0.00	(-) Control	644.04	0.00
1 μg (16.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1111.92	-8.30	1 μg (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	636.36	1.19
10 μg (166.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1085.61	-5.74	10 μg (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	680.47	-5.66
50 μg (833.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			50 μg (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	681.86	-5.87
100 μg (1666.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	939.48	8.49	100 μg (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	706.76	-9.74
200 μg (3333.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1085.77	-5.76	200 μg (1mg/ml)	217.03	60.03
500 μg (8333.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			500 μg (2.5mg/ml)		

*, ** same as legend on Table 11.

Table 11, 12, 13, 14 에서 Naringin, 감귤피 추출물 및 Naringenin의 효소저해 활성도를 대조물질인 Pravastatin과 비교해 볼 때 in vitro에서 시험 물질 중 Naringenin 만이 HMG-CoA reductase 와 ACAT 에 대해 그 저해활성이 우수하였다. Naringenin의 효소저해 활성능을 그림으로 나타내면 Fig. 9, 10과 같은데 이 물질은 ACAT보다 HMG-CoA reductase에 대한 저해활성이 더욱 우수하였다.

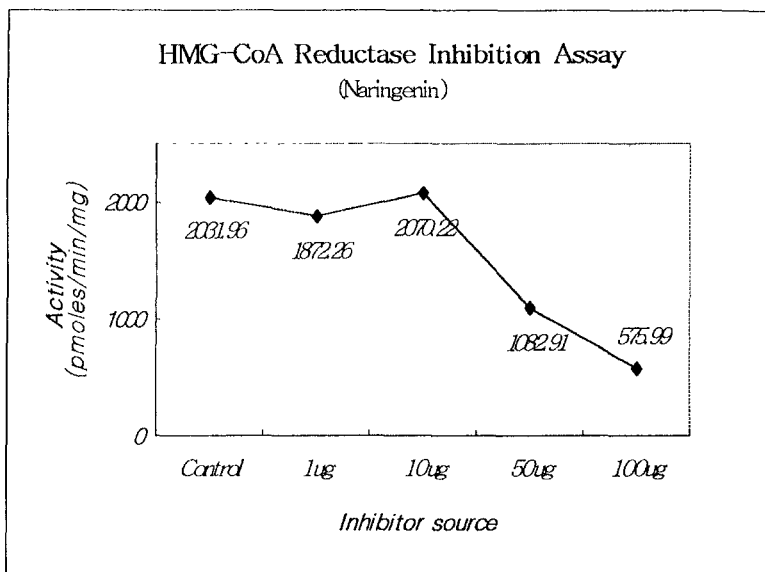


Fig. 9. Changes in HMG-CoA reductase activity by increasing concentration of Naringenin added as an HMG-CoA reductase inhibitor source.

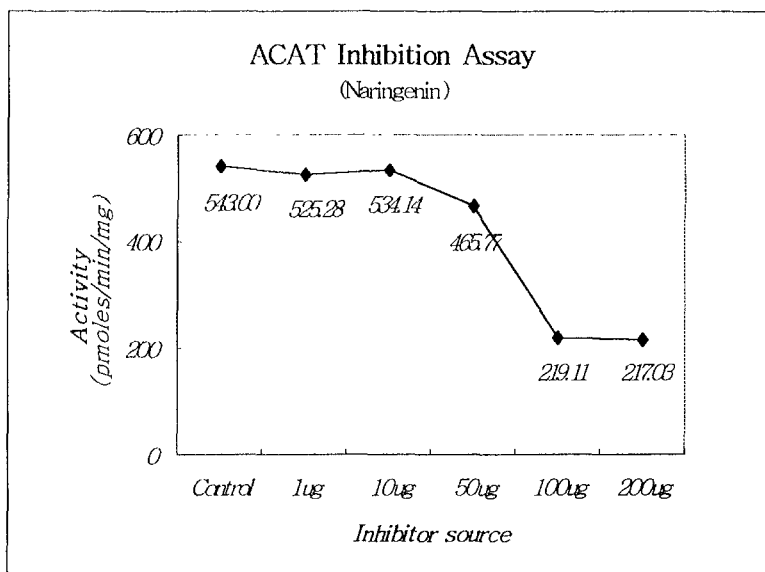


Fig. 10. Changes in HMG-CoA reductase activity by increasing concentration of Naringenin added as an HMG-CoA reductase inhibitor source.

제 3 절 High cholesterol diet 를 급여한 동물들을 대상으로 굴피추출물과 그 구성성분에 대한 *in vivo* 역가 실험결과 (동물실험 II)

식이군간 혈장의 총 콜레스테롤농도 비교(Table 15)에서 group B인 hesperidin 투여군을 제외한 모든 실험군들은 대조군인 control group에 비해 그 수준이 유의적으로 낮게 나타났다. 그리고 총 콜레스테롤에 대한 HDL-cholesterol 의 비율은 group C(Naringin), group D (Hesperidin + Naringin) 그리고 group G(감귤피 추출물) 들이 타 식이군에 비해 유의적으로 높았다. 혈장 중성지질 수준은 group E(Hesperitine)가 제일 높았고 타 그룹들은 비슷한 수준이었다. 동맥경화유발에 대한 위험성 지표인 atherogenic index는 group A(control)와 group B(Hesperidin)가 나머지 타 그룹들보다 유의적으로 높게 나타나 총 콜레스테롤농도 변화와 거의 일치된 관계를 보였으며 그 중 Naringin, Naringin + Hesperidine, 감귤피추출물군이 가장 유의하게 나타났다. 즉 시험물질 중 hesperidin을 제외한 모든 물질들(Naringin, Naringenin, Hesperidine, 감귤피 추출물)은 혈중 콜레스테롤 저하효능면에서 유의적으로 우수하였다.

한편 간 조직의 콜레스테롤 합성수준을 조절하는 율속효소인 HMG-CoA reductase의 활성화도는 모든 시험물질 투여군들(group B~group G)이 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며 그 중 group F(Naringenin)와 group G(감귤피 추출물)가 가장 낮게 나타났다. 또한 간 조직의 free cholesterol 을 에스테르화하는 효소인 ACAT의 활성화도 시험물질 투여군 중 group B (Hesperidin)를 제외한 모든 군들이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 따라서 HMG-CoA reductase와 ACAT 활성화도 수준은 동일 식이군에서 거의 같은 경향을 보였다.

시험물질 투여군에서는 분변으로 배설되는 총 중성스테롤(total neutral sterol) 양도 혈장 총 콜레스테롤 농도나 HMG-CoA reductase 활성화도 경향과 같이 그 수준이 감소되었는데, 각 fecal sterol (cholesterol, coprostanol, coprostanone)의 배설양도 시험물질을 투여한 군(group B~group G)이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다.

이상의 결과를 종합하면 시험물질 투여군들의 혈장 콜레스테롤 수준이 대조군보다 유의적으로 낮았고, 간의 콜레스테롤 합성수준도 감소되었다. 그러나 이들 시험물질

투여군들의 분변 스테롤 배설양도 대조군에 비해 오히려 낮게 나타나 시험물질들의 콜레스테롤 저하작용에 대한 기전은 지금까지 밝혀진 콜레스테롤 강하제로 알려진 물질들의 작용기작과에 비해 약간 다른 것으로 추측된다. 토끼를 사용하는 후속 동물실험에서 그 기작이 밝혀지겠지만, 현재의 결과만으로 가능한 작용기작을 분석하면 혈장 콜레스테롤을 간으로 받아들이는 간조직의 lipoprotein receptor 활성화에 대한 변화가 주목된다. 시험물질을 투여하지 않은 대조군의 혈장 콜레스테롤 수준 및 분변 스테롤 배설량을 콜레스테롤 대사경로와 연관지워 보면 hepatic lipoprotein receptor 들의 활성이 계속되는 고콜레스테롤 식이의 투여로 인해 크게 감소된 것으로 추측된다. 따라서 대조군의 간 조직은 필요한 콜레스테롤을 자체조직에서 스스로 합성해 그 수준을 충족시켜야 하므로 HMG-CoA reductase 활성이 증가되었다고 추측된다. 또한 대조군 혈장내의 콜레스테롤은 간의 hepatic lipoprotein receptor 활성화의 결핍으로 간으로 운반되지 못하고 혈장에 그대로 축적되므로 고콜레스테롤혈증이 유도되었으며, 그로인해 소장의 콜레스테롤 흡수율도 시험물질 투여군에 비해 상대적으로 감소되었으므로, 그 결과 분변으로 배설되는 sterol 양도 증가된 것으로 사료된다. 그와 반대로 시험물질 투여군에서는 시험물질 활성성분에 의해 간의 receptor 활성이 증가된 것으로 유추되며, 따라서 혈장으로부터 간으로의 콜레스테롤 유입이 많아져 간조직 자체에서 생성하는 콜레스테롤 양도 negative feedback mechanism에 의해 감소된 것으로 사료된다. 따라서 시험물질 투여군의 혈장 콜레스테롤은 계속적으로 간으로 운반되어 사용될 수 있으므로 그 수준이 점차로 감소되고 소장의 콜레스테롤 흡수율은 상대적으로 증가되어 분변으로의 배설이 대조군에 비해 감소된 것으로 보인다. 이러한 작용기전은 타 동물실험(특히 사람의 지질대사 경로와 비슷한 system을 갖춘 토끼모델)에서 더욱 구체적으로 명확하게 입증되어야 하겠다.

Table 15. Plasma and liver lipids, fecal sterol, and liver enzyme activities of rats fed control and experimental diets in animal experiment I

Group lipids conc.	A	B	C	D	E	F	G
Total-C(mg/dl)	147.8 ±34.8 ^a	131.6 ±29.7 ^{ab}	100.8 ±16.1 ^{cd}	93.4 ±12.1 ^d	125.1 ±15.6 ^b	120.9 ±25.9 ^{bc}	94.2 ±23 ^d
HDL-C(mg/dl)	22.2	18.7	24.0	27.6	25.7	23.4	23.5
HDL-C Total-C (%)	15.7 ±5.3 ^a	15 ±4.9 ^a	23.9 ±7.6 ^{bc}	29.9 ±8 ^c	20 ±5.6 ^{ab}	20.8 ±9.1 ^{ab}	26.2 ±7.5 ^{bc}
TG(mg/dl)	99.2 ±18.9 ^{abc}	92.7 ±20.5 ^{ab}	86.7 ±14.6 ^a	90.9 ±12.2 ^{ab}	114.6 ±18.8 ^c	103.4 ±18.2 ^{abc}	108.5 ±15.9 ^{bc}
Athero. Index	6.3 ±3.4 ^{ab}	6.7 ±3.6 ^a	3.6 ±1.4 ^c	2.6 ±1.1 ^c	4.3 ±1.2 ^{bc}	4.6 ±2.1 ^{bc}	3.1 ±1.2 ^c
HMG-CoA reductase activities (pmole/min/mg protein)	2487.2 ±210.5 ^a	1896.7 ±213.4 ^{bc}	1879.8 ±236.9 ^{bc}	1783.4 ±282.6 ^c	2005.0 ±242.0 ^b	1715.7 ±123.5 ^{cd}	1565.1 ±106.6 ^d
ACAT activities (pmoles/min/ mg protein)	806.2 ±105.2 ^a	651.2 ±86.0 ^b	643.5 ±80.7 ^b	615.8 ±80.1 ^b	616.4 ±60.5 ^b	663.4 ±65.3 ^b	548.0 ±65.4 ^c
Total fecal sterol (mg/day)	521.87 ^a	254.27 ^b	204.66 ^b	208.06 ^b	178.74 ^b	242.75 ^b	211.08 ^b
Cholesterol	454.12 ±47.9 ^a	207.38 ±22.5 ^b	165.15 ±23.4 ^b	170.3 ±27.7 ^b	144.27 ±12.6 ^b	200.25 ±23.6 ^b	182.93 ±22.4 ^b
Coprostanol	6.95 ±1.2 ^a	5.79 ±0.6 ^{ab}	4.41 ±0.5 ^{bc}	4.36 ±0.6 ^{bc}	3.37 ±0.2 ^c	4.7 ±0.5 ^{bc}	4.95 ±0.4 ^{abc}
Coprostanone	60.8 ±6.3 ^a	41.1 ±4.8 ^b	35.1 ±4.7 ^{bc}	33.4 ±3.5 ^{bc}	31.1 ±1.8 ^{bc}	37.8 ±4.8 ^b	23.2 ±5.1 ^c

(A : High-cholesterol control, B : Hesperidin, C : Naringin, D : Hesperidin + Naringin, E : Hespiretin, F : Naringenin, G : 감귤피 추출물)

제 4 절 High cholesterol 과 high fat diet를 동시 급여한 흰쥐 를 대상으로한 글리피추출물과 그 구성성분에 대한 *in vivo* 역가 실험결과 (동물실험 III)

앞서 실시한 동물실험 II의 실험결과 분석에서 그 효능이 다른 시험물질에 비해 우수한 것으로 나타난 naringin의 투여수준은 2가지로 하되 그 결과를 타 연구자들에 의해 콜레스테롤 저하효능이 입증된 lovastatin과 비교하였다. 그리고 이 실험에서 동물들은 동물실험 1에 사용된 식이(사료)에 포함된 식물성 식이지방(5%)을 동물성 포화지방(15%)으로 대체한 식이로 사육되었다. 그 결과 동물실험 II에서 나타난 naringin의 콜레스테롤 저하효능은 본 동물실험에서도 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났지만, 그 효능정도는 Table 16에서와 같이 동물실험 II에 비해 다소 약화된 듯하다. 그 이유는 과량의 포화지방산이 동물실험 III의 식이에 추가됨과 동시에 시험물질의 투여용량이 동물실험 II 수준의 20% 내지 50%로 제한시킨 결과다.

구체적으로 비교하면 tabel 16에 제시된 바와같이 혈장 총 콜레스테롤 수준은 naringin과 lovastatin 투여군이 그 투여수준에 관계없이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 총 콜레스테롤에 대한 HDL-cholesterol 비율은 모든 군에서 거의 동일한 수준이었지만, Friedwald 공식에 의해 산출된 LDL-cholesterol 수준은 group 3(naringin with low dose)만이 group 7(lovastatin with high dose)에 비해 낮게 나타났다. 또한 혈장 중성지질수준은 group 3 (naringin with low dose), group 5(lovastatin with low dose), group 6(lovastatin with high dose) 들이 상대적으로 낮았고 그 중 두 수준의 lovastatin group이 유의적으로 가장 낮게 나타났다.

HMG-CoA reductase 활성수준 비교에서는 동물실험 1과 유사하게 naringin의 효능이 뚜렷하게 제현되었다. 시험물질들 중 naringin군들과 감귤피군들이 대조군에 비해 그 효소활성이 유의적으로 감소되었는데 특히 naringin군들이 감귤피군들보다 더욱 큰 폭으로 감소되었다. 또한 ACAT 활성도 수준의 비교결과에서는 시험물질을 투여한 모든 실험군들의 활성도가 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 그러므로 2차년도에는 naringin의 콜레스테롤 저하효능이 명확하게 정립되었으며 다음 3차년도에는 최종단계의 임상실험을 위한 추가적인 동물실험의 수행이 요구된다.

그밖에 시험물질들이 간 조직에 미치는 독성여부를 간접적으로 관찰하기 위해 GOT 및 GPT 활성도를 측정한 결과, 감귤피군을 제외한 모든 시험물질 투여군들이 대조군에 비해 유의적으로 감소되었으며, GPT 활성은 시험물질 투여군들 중 group

4(naringin with high dose), group 5(lovastatin with low dose), group 6(lovastatin with high dose) 군들의 수준이 타 식이군에 비해 감소되었으며 특히 두 수준의 lovastatin group이 가장 많이 감소되었다. 또한 동물희생시 관찰된 각 식이군의 간 조직 외형을 비교했을 때 lovastatin을 high dose로 투여한 군의 동물간에서는 심한 지방간 형태가 관찰되었는데 이는 lovastatin의 과량투여(0.05% of diet)에 의한 부작용에 기인하는 것으로 판단되었다. 그러나 시험물질 naringin은 lovastatin 군과 동일양으로 투여해도 그러한 지방간 유도현상이 전혀 없었다.

Table 16. Plasma lipids and liver enzyme activities of rats fed control and experimental diets in animal experiment 2.

	Group1 (Control)	Group2 (꿀피)	Group3 (Naringin low dose)	Group4 (Naringin high dose)	Group5 (Lovastatin low dose)	Group6 (Lovastatin high dose)
Total cholesterol (mg/dl)	134.9 ±28.33 ^a	123.8 ±16.91 ^{ab}	111.7 ±18.03 ^b	109.2 ±11.45 ^b	94.1 ±10.67 ^b	106.1 ±25.15 ^b
HDL cholesterol (mg/dl)	17.84 ±3.60 ^{ab}	20.20 ±3.72 ^a	18.14 ±1.51 ^{ab}	19.56 ±3.77 ^{ab}	14.78 ±3.73 ^{ab}	15.21 ±4.03 ^b
LDL cholesterol (mg/dl)	94.67 ±11.51 ^{ac}	89.00 ±11.89 ^{ac}	85.92 ±17.97 ^a	88.29 ±12.37 ^{ac}	98.65 ±9.94 ^{bc}	101.92 ±6.92 ^c
TG (mg/dl)	56.67 ±12.68 ^{ab}	62.00 ±9.68 ^a	43.17 ±10.73 ^{ad}	73.67 ±17.20 ^c	41.39 ±8.36 ^d	38.78 ±12.60 ^d
HDL/Total (%)	13.38 ±4.79 ^a	16.70 ±4.29 ^a	15.95 ±4.86 ^a	17.10 ±5.36 ^a	15.81 ±3.82 ^a	12.30 ±8.66 ^a
GOT (Karmen/ml)	79.84 ±32.65 ^a	56.38 ±13.92 ^b	55.02 ±14.93 ^b	45.55 ±6.65 ^b	57.08 ±14.77 ^b	58.71 ±11.54 ^b
GPT (Karmen/ml)	47.20 ±24.33 ^a	42.10 ±34.10 ^{ab}	44.74 ±34.23 ^{ab}	18.86 ±11.11 ^{bc}	9.52 ±8.56 ^c	11.95 ±11.18 ^{cd}
HMG-CoA reductase activities (pmoles/min/ mg · protein)	5204 ±1057 ^a	3799 ±869 ^{bd}	2392 ±429 ^c	3152 ±809 ^{bc}	4721 ±985 ^a	4430 ±1259 ^{ad}
ACAT activities (pmoles/min/ mg · protein)	1145 ±86 ^a	860 ±112 ^b	878 ±167 ^{bc}	979 ±78 ^c	883 ±78 ^{bc}	885 ±157 ^{bc}

제 5 절 대추추출물의 효능 및 naringin과 병합투여 효능확 인을 위한 동물실험 결과 (동물실험 IV)

1. 식이 섭취량 및 체중 증가량

실험식이를 급여한 기간동안의 1일 평균 사료섭취량과 6주동안의 체중 증가량은 Table 17와 같다. 이들 두 변수는 각 식이군간 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 17. Daily food intakes and body weight gains in rats fed the control and experimental diets

Lipids conc. / Group	대조군	대추엑기스	(대추+ 감귤피) 엑기스	대추엑기스 + 감귤피분말	대추엑기스 + naringin	(대추+감귤 피+양파+ 마늘+생강) 분말
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Food Intakes (g/day)	22.62	21.56	22.22	20.61	20.53	21.16
Body Weight Gains (g/6wks)	231 ± 4.73	227.4 ± 3.55	230.4 ± 4.15	218.67 ± 3.23	238.3 ± 6.32	233.7 ± 4.06

2. 장기중량

식이군간 장기중량의 비교(Table 18)에서는 group 4의 간과 심장의 중량이 타군에 비해 낮았다. 그리고 group 6에서는 심장의 중량만이 group 4를 제외한 나머지군들에 비해 낮게 나타났다.

Table 18. Weights of liver, heart and kidney in rats fed high-cholesterol diets supplemented with various test materials

Lipids conc. / Group	대조군	대추엑기스	(대추+ 감귤피) 엑기스	대추엑기스 + 감귤피분말	대추엑기스 + naringin	(대추+감귤피+양파+마늘+생강) 분말
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Liver (g)	15.53±0.66	14.57±0.34	14.27±0.38	13.98±0.27*	16.02±0.86	15.23±0.56
Heart (g)	1.16±0.37	1.12±0.21	1.10±0.19	0.99±0.22***	1.11±0.24	1.04±0.21**
Kidney (g)	2.47±0.37	2.47±0.51	2.48±0.37	2.46±0.64	2.46±0.65	2.55±0.58

3. 혈장 지질농도

혈장 total-cholesterol 수준은 Table 19과 같이 식이군간 유의적 차이는 없었지만 대추분말에 양념소오스 성분인 양파, 마늘, 생강분말을 혼합하여 급여한 group 6에서 낮게 나타난 경향을 보였다. HDL-C 수준은 group 3(대추엑기스+감귤피엑기스), group 5(대추엑기스+naringin), group 6(대추분말+감귤피분말+양념분말)이 나머지 식이군에 비해 유의적으로 보였는데 특히 group 5와 group 6에서 훨씬 높게 나타났다. Total-cholesterol에 대한 HDL-C의 비율은 group 3과 group 6이 나머지군들에 비해 높아 HDL-C 수준변화와 비슷하나 group 4는 달리 나타났다. 혈장 중성지질 농도는 group 5와 group 6이 나머지군들에 비해 훨씬 높게 나타났으나 그 이유를 알수 없었다. 혈장 중성지질의 수준변화는 total-cholesterol과 비교시 일관성이 없는것으로 보고되기는 하나 이들 두군에서만 높게 나타난다는 결과에 대해 납득할 만한 근거를 찾기는 어려웠다. 동맥경화유발에 대한 위험척도인 Atherogenic index는 HDL-C의 비율(%)과 일치되었는데 group 3과 group 6의 AI가 나머지군들보다 유의적으로 낮게 나타났다.

Table 19. Plasma lipid concentrations in rats fed high-cholesterol diets supplemented with various test materials

Group Lipids conc.	대조군	대추엑기스	(대추+ 감귤피) 엑기스	대추엑기스 + 감귤피분말	대추엑기스 + naringin	(대추+감귤 피+양파+ 마늘+생강) 분말
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Total-C (mg/dl)	151.0± 7.2	165.8± 13.4	169.9± 10.1	144.2± 4.5	170.8± 170.8	137.2± 8.7
HDL-C(mg/dl)	47.7± 3.0	51.6± 8.3	↑66.7± 3.8*	51.3± 3.1	↑64.0± 3.3**	↑71.3± 5.8**
HDL-C ———(%) Total-C	31.5± 2.4	31.1± 1.9	↑39.2± 1.3*	35.6± 1.8	37.4± 1.7	52.0± 2.9**
TG(mg/dl)	85.0± 11.4	51.6± 8.3	77.8± 8.2	83.8± 8.7	227.7± 30.7***	147.3± 8.9***
Athero. Index	2.3± 0.3	3.4± 1.3	↓1.6± 0.2*	1.9± 0.2	1.7± 0.2	↓1.0± 0.2***

Mean±SD

* Significantly different from control (P<0.05).

** Significantly different from control (P<0.01).

*** Significantly different from control (P<0.001).

제 6 절 Citrus bioflavonoid와 인삼이 vitamin E 수준이 다 른 diet에 보충된 경우 고지혈증 예방효과에 미치는 영향분석 (동물실험 V)

1. 식이 섭취량 및 체중 증가량

실험식이를 급여한 기간동안의 1일 평균 사료섭취량과 평균 체중 증가량은 Table 20과 같다. 이들 두 변수는 각 식이군간 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 체중 및 식이섭취량이 타변수의 분석결과에 미치는 영향은 전혀 없는 것으로 확인되었다.

Table 20. Daily food intakes and body weight gains in rats fed the control and experimental diets supplemented with high cholesterol and different Vit. E levels

Lipids conc.	Group	Low Control	Normal Control	Low Naringin	Normal Naringin	Low Hesperidin	Normal Hesperidin	Low Ginseng	Normal Ginseng
		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
Food Intakes (g/day)		19.44 ± 0.44	20.66 ± 0.42	19.98 ± 0.20	20.01 ± 0.41	20.47 ± 0.31	20.17 ± 0.37	19.89 ± 0.32	19.58 ± 0.32
Body Weight Gains (g/wks)		45.08 ± 1.00	46.00 ± 1.32	45.38 ± 1.6	45.68 ± 1.68	45.54 ± 1.38	43.32 ± 1.29	41.88 ± 1.03	42.76 ± 0.96

Mean ± SE

Low and normal mean marginal level vit. E and normal level vit. E in diet respectively.

2. 장기증량

식이군간 장기증량의 비교(Table 21) 결과에서는 간증량에는 전혀 차이가 없었으며 심장증량은 두 hesperidin군 (group 5 & group 6)과 high vit. E와 naringin이 보충된 식이를 급여한 group 4가 타군에 비해 높게 나타났다. 신장의 증량은 low vit. E와 인삼이 보충된 식이를 급여한 group 7이 타군에 비해 높은 경향을 보이나 이들 장기조직들의 비대현상은 전혀 관찰되지 않았다.

Table 21. Weights of liver, heart and kidney in rats fed the control and experimental diets supplemented with high cholesterol and different Vit. E levels

Group Lipids conc.	Low Control	Normal Control	Low Naringin	Normal Naringin	Low Hesperidin	Normal Hesperidin	Low Ginseng	Normal Ginseng
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
Liver (g)	13.58 ± 0.36 ^{ab}	13.82 ± 0.61 ^{ab}	13.32 ± 0.41 ^{ab}	13.41 ± 0.6 ^{ab}	14.20 ± 0.71 ^b	12.79 ± 0.51 ^{ab}	13.16 ± 0.35 ^{ab}	12.33 ± 0.41 ^a
Heart (g)	1.16 ± 0.04 ^{ab}	1.11 ± 0.03 ^{ab}	1.17 ± 0.03 ^{ab}	1.18 ± 0.04 ^b	1.18 ± 0.05 ^b	1.18 ± 0.02 ^b	1.07 ± 0.02 ^a	1.1 ± 0.03 ^{ab}
Kidney (g)	2.45 ± 0.04 ^a	2.32 ± 0.07 ^{ab}	2.41 ± 0.06 ^{ab}	2.34 ± 0.06 ^{ab}	2.32 ± 0.08 ^{ab}	2.25 ± 0.09 ^{ab}	2.21 ± 0.05 ^b	2.3 ± 0.07 ^{ab}

Each value represents the mean±SE.

Low and normal mean marginal level vit. E and normal level vit. E in diet respectively. Different superscripts in the same row indicate significant difference (P<0.05) among groups by Duncan's multiple comparison test.

3. 혈장 지질농도

동물의 고콜레스테롤(1%)식이에 vit. E 수준이 최저 요구량(Low or marginal dietary level)으로 포함될 경우 citrus bioflavonoid의 보충효과가 부족한 vit. E의 체내 항산화역할을 대체할지의 여부를 혈장 지질농도와 관련된 변수를 통해 조사하였다. Vit. E 수준이 최저 요구량으로 포함된 식이를 급여한 각군들(Low control, Low naringin, Low hesperidin, Low ginseng)의 비교군으로는 이와 대응되는 정상수준(Normal or recommended dietary level)의 vit. E가 보충된 식이를 급여한 각 정상군(Normal control, Normal naringin, Normal hesperidin, Normal ginseng)의 혈장 지질변수를 비교, 분석 하였다. 또한 식이 vit. E 수준이 최저 요구량으로 포함된 식이군간들의 비교분석도 실시하였다. 그 결과 Table 22에 제시된바와 같이 최저 요구량의 vit. E 수준이 bioflavonoid와 함께 고콜레스테롤 식이에 보충된 경우에도 citrus bioflavonoid의 혈장 콜레스테롤 저하효과가 유의적으로 반영되었다 (low control : low naringin : low hesperidin). 즉 group 1, group 3, group 5의 비교에서 low

naringin군(121.98 mg/dl)과 low hesperidin군(112.19 mg/dl)의 혈장 총 콜레스테롤 수준은 low control군(148.01 mg/dl)에 비해 유의적으로 감소되었다.

본 실험에 사용된 marginal level의 vit. E 수준치는 고콜레스테롤 식이가 아닌 일반 실험식이에 대해 정의된것이므로, 이 수준의 vit. E가 고콜레스테롤 식이에 포함될 경우 일반적으로 고콜레스테롤에 의한 산화스트레스(oxidative stress)가 동반되며 그 결과 혈장 총 콜레스테롤 수준이 상승된다. 그러나 본 실험결과와 bioflavonoid군들(group 3, group 4, group 5, group 6)은 low control군(고콜레스테롤 식이에 최저요구량의 vit. E만 보충한 군)에 비해 혈장 콜레스테롤 수준이 모두 낮게 나타난 것으로 보아, naringin과 hesperidin이 식이에 부족한 vit. E의 항산화 작용을 대체하는 일종의 보조작용을 한것으로 사료된다. 인삼분말 보충군인 group 7 및 group 8의 비교결과에서도 vit. E의 항산화기능이 유의적으로 확인되었으나 (low control : high ginseng), low control군과 low ginseng군간에는 인삼분말의 항산화 효과가 유의적으로 인정되지 않았다. 즉 Vit. E가 최저 요구량으로 포함된 식이를 급여한 low control군(148.01 mg/dl)과 low ginseng군(134.99 mg/dl)의 총 콜레스테롤 농도는 유의적 차이가 없었으나, 정상수준의 Vit. E가 포함된 normal control군(131.35 mg/dl)은 normal ginseng군(112.33 mg/dl)에 비해 유의적으로 높았다. Vit. E 보충수준이 낮은 식이군들 (group 3, group 5, group 7)의 비교에서 naringin과 hesperidin의 항산화기능은 인삼분말 보충군인 group 7에 비해 우수하게 나타났다.

혈장 HDL-cholesterol 농도는 normal control군이 가장 높았으나 총 콜레스테롤에 대한 HDL-cholesterol의 비율은 low control군, low ginseng군 및 normal naringin군이 타 식이군들에 비해 낮은 경향을 보였다.

혈장 중성지질 농도의 비교결과에서는 혈장 총콜레스테롤 농도와는 달리 naringin 또는 hesperidin의 보충 및 vit. E의 보충수준이 혈장 중성지질 농도에 미치는 영향은 전혀 나타나지 않았다. 모든 식이군의 중성지질 농도는 정상 범위내에 있었으며 인삼보충군(Low ginseng, Normal ginseng)이 flavonoid 보충 식이군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 혈장 중성지질농도는 식이 vit. E의 보충 수준과는 무관하게 low hesperidin군과 normal hesperidin군에서 높게 나타나 일관성 없는 변화를 보였다.

동맥경화유발의 위험성을 나타내는 atherogenic index의 비교에서는 vit. E가 정상수준으로 보충된 경우가 최저 요구량으로 보충된 각 비교군에 비해 유의성은 없지만 감소된 경향으로 나타나 혈장 콜레스테롤 수준에서와 유사한 현상을 보였다(단 naringin군은 제외). 식이군간 유의적 차이는 low naringin군이 normal control군에

비해 높게 나타난 현상만 관찰되었다.

이상과 같이 각 식이군간 혈장 지질 농도 분석, 비교 결과에서 citrus bioflavonoid인 naringin과 hesperidin의 보충효과는 vit. E의 보조 또는 대체 작용으로 나타났다. 그 결과는 혈장 총 콜레스테롤농도의 군간 비교 결과에서 가장 뚜렷하게 반영되었으며 동물사육기간이 5주 이상으로 연장될 경우 그 효과는 HDL-cholesterol 농도에도 반영될 것으로 사료된다.

Table 22. Plasma lipid concentrations in rats fed the control and experimental diets supplemented with high cholesterol and different Vit. E levels

lipids conc.	Group	Low Control	Normal Control 1	Low Naringin	Normal Naringin	Low Hesperidin	Normal Hesperidin	Low Ginseng	Normal Ginseng
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8	
Total-C (mg/dl)	148.01 ±9.80 ^a	131.35 ±5.93 ^{ac}	120.98 ±5.45 ^{cd}	121.36 ±5.22 ^{cd}	112.19 ±4.01 ^{bd}	101.15 ±2.80 ^b	134.99 ±5.09 ^{ac}	112.33 ±8.30 ^{bd}	
HDL-C (mg/dl)	25.71 ±2.11 ^{NS}	27.98 ±2.69	29.67 ±2.53	26.76 ±1.44	26.56 ±2.00	26.08 ±3.07	22.84 ±2.15	24.20 ±1.94	
HDL-C / Total-C (%)	17.49 ±2.29 ^a	20.78 ±2.35 ^{ab}	25.56 ±5.11 ^c	22.10 ±1.38 ^b	22.43 ±2.28 ^{bc}	25.96 ±2.85 ^c	17.12 ±1.66 ^a	22.66 ±2.20 ^{bc}	
TG (mg/dl)	102.94 ±6.22 ^a	97.28 ±4.25 ^a	78.37 ±6.91 ^b	78.00 ±9.33 ^b	97.53 ±8.80 ^a	89.19 ±4.75 ^a	58.10 ±4.14 ^c	55.76 ±4.37 ^c	
Atherogenic Index	5.17 ±0.91 ^a	3.69 ±0.40 ^b	3.41 ±0.94 ^{ab}	3.54 ±0.23 ^b	3.22 ±0.67 ^b	3.17 ±0.49 ^b	5.35 ±0.61 ^a	3.96 ±0.59 ^{ab}	

Each value represents the mean±SE.

Low and normal mean marginal level vit. E and normal level vit. E in diet respectively. Different superscripts in the same row indicate significant difference (P<0.05) among groups by Duncan's multiple comparison test.

Atherogenic index = (Total-C - HDL-C)/HDL-C

4. Hepatic HMG-CoA reductase activities

간의 콜레스테롤 합성을 조절하는 HMG-CoA reductase의 활성도는 Table 23과 같이 2개의 ginseng군에서 가장 높고, 그 다음은 control군들이며, naringin과 hesperidin 군들에서는 비교적 낮은 수준으로 나타났다. 이 결과는 선행된 실험결과와 naringin 및 hesperidin 효과와 유사하며, vit. E의 보충수준과는 무관하게 naringin군과 hesperidin군들은 ginseng군들에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 혈장 총 콜레스테롤 수준이 낮으면 콜레스테롤 대사의 항상성조절 결과로 HMG-CoA reductase 활성도가 상승될 수도 있으나 bioflavonoid와 ginseng의 콜레스테롤 저하 작용 기작은 서로 다른 것으로 평가된다.

Table 23. Hepatic HMG-CoA reductase activities in rats fed the control and experimental diets supplemented with high cholesterol and different Vit. E levels

Group Lipids conc.	Low Control	Normal Control	Low Naringin	Normal Naringin	Low Hespe- ridin	Normal Hespe- ridin	Low Ginseng	Normal Ginseng
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
HMG-CoA reductase activities (pmole/min/mg protein)	111.04 ± 9.87 ^{abc}	106.48 ± 11.41 ^{abc}	83.79 ± 12.33 ^a	95.23 ± 9.47 ^{ab}	88.81 ± 12.91 ^{ab}	97.57 ± 15.25 ^{abc}	146.28 ± 24.36 ^c	140.92 ± 17.02 ^{bc}

Each value represents the mean±SE.

Low and normal mean marginal level vit. E and normal level vit. E in diet respectively. Different superscripts in the same row indicate significant difference (P<0.05) among groups by Duncan's multiple comparison test.

5. 간조직의 지질 수준에 미치는 영향

간의 지질 분석 결과는 Fig. 11과 같다. 콜레스테롤 수준은 low-E control군에 비해 normal-E naringin군만이 유의적으로 낮았다. Vit. E의 보충 효과가 간 콜레스테롤 저하에 미치는 작용은 유의성은 없었으나 그 경향은 감소하는 것으로 관찰되었다. 중성지질 수준은 정상수준의 Vit. E군들간 비교에서 대조군(227.10 mg/g liver)에 비해 naringin군(167.79 mg/g liver)과 hesperidin군(175.88 mg/g liver)이 유의적

($p < 0.05$)으로 낮았으며 최소 수준 Vit. E군들간 비교에서는 low-E hesperidin군이 대조군에 비해 낮게 나타났다. Low-E naringin군을 제외한 세 flavonoid군들에서는 식이 Vit. E 수준과는 무관하게 이들의 간 중성지질 저하 효과가 관찰되었다. 종합적으로는 정상수준 Vit. E에 naringin을 보충한 식이가 간의 지질 저하 작용에 가장 우수한 것으로 평가되었다.

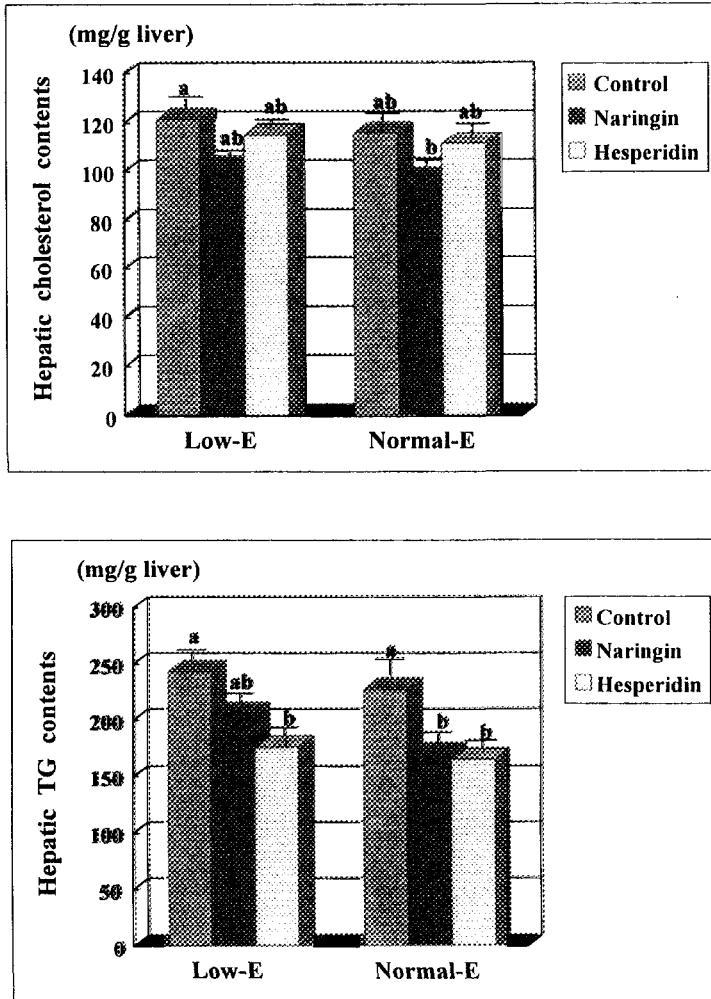


Fig. 11. Hepatic cholesterol and TG concentrations in rats fed the high-cholesterol diets of the different levels of Vit. E supplemented with naringin or hesperidin. ^{ab}Values not sharing a common superscript are significantly different among groups at $p < 0.05$.

6. 간조직의 항산화효소 활성화도

간조직의 항산화 활성화에 미치는 영향은 Fig. 12과 같다. SOD 활성화도는 대조군에 비해 모든 실험군들이 감소 경향을 보였지만 식이 Vit. E 수준 또는 bioflavonoid 보충 여부에 관련없이 일정수준으로 유지됨을 보였다. Catalase 활성화도는 식이 Vit. E의 수준에는 영향을 받지 않았다. Naringin과 hesperidin이 최소수준 Vit. E 식이에 보충될 때에는 naringin이 hesperidin에 비해 catalase활성도가 유의적으로 높게 관찰되었고, 정상수준 Vit. E 식이에 보충되었을 때는 유의성은 없지만 동일한 경향을 보였다. GSH-Px 활성화도 또한 식이 Vit. E 수준에 일관된 영향을 받지 않았지만, 대조군과 hesperidin군 경우 식이 Vit. E 증가에 의한 효소 활성화도 증가 경향을 보였다. 정상수준의 Vit. E 대조군과 naringin군간 비교에서는 naringin에 의한 GSH-Px 활성화도 감소가 유의적이지만 flavonoid군들 간의 차이는 없었다.

이와 같이 항산화 효소들간의 비교에서는 일관적인 유의성은 없지만 catalase 활성화도의 경우 Vit. E 첨가로 그 활성화도가 감소하는 경향이었고 GSH-Px 활성화도는 Vit. E 첨가로 활성화도 증가 경향을 보였다.

7. 혈장 과산화 지질과 Vit. E 농도

혈장 Vit. E 정량과 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance)로 측정된 혈장 과산화 지질 수준 결과는 Fig. 13과 같다. 혈장 Vit. E 수준은 최소 수준의 Vit. E군들 간 비교에서 low-E naringin군에 비해 low-E control군 보다 유의적으로 높았고, 최소수준의 Vit. E군과 각 정상수준의 Vit. E군간 비교에서는 Vit. E 보충수준에 따른 혈장 Vit. E 농도차가 확연히 드러났다. 대조군들과 각 flavonoid군들간 비교에서 low-E control과 low-E naringin군간 그리고, normal-E control과 normal-E naringin군간에서 모두 유의적인 차이가 나타나 naringin의 보충 효과가 혈장의 Vit. E 농도에서도 반영되었다.

지질 과산화 수준은 식이 Vit. E 수준 또는 flavonoid 보충여부에 따른 영향을 받지 않았지만, 최소량의 Vit. E 수준으로도 TBA 생성을 어느정도 억제할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

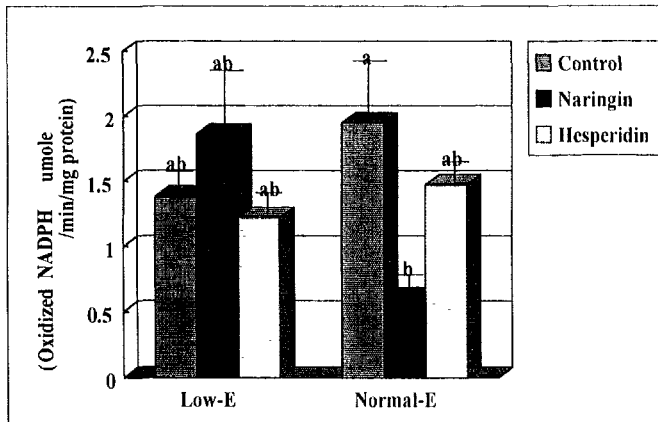
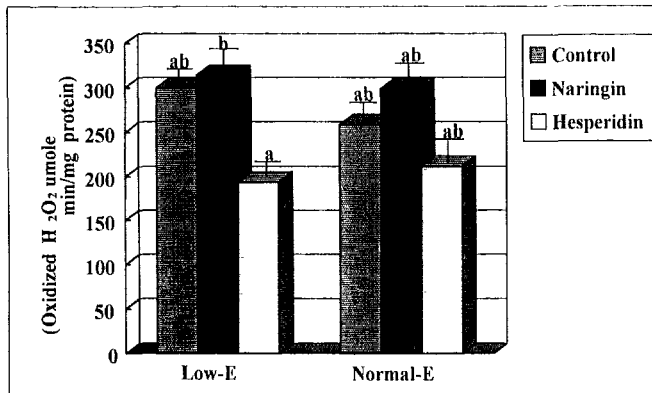
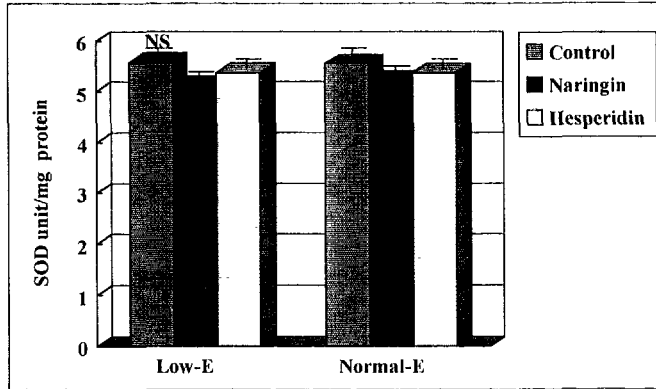


Fig. 12. Hepatic antioxidative activities in rats fed the high-cholesterol diets of the different levels of Vit. E supplemented with naringin or hesperidin. ^{abc} Values not sharing a common superscript are significantly different among groups at $p < 0.05$.

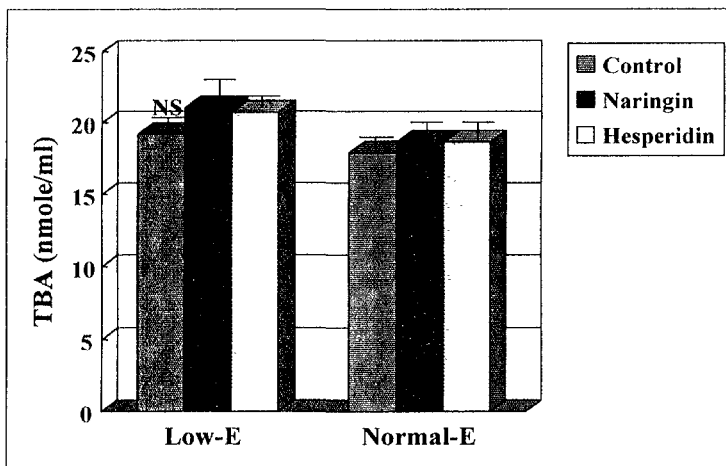
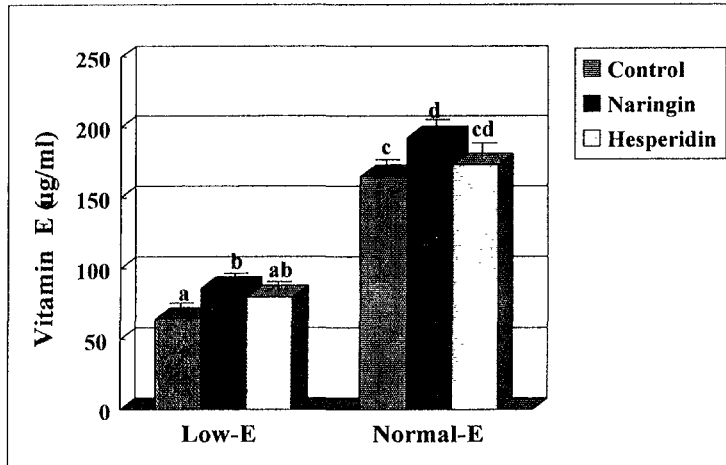


Fig. 13. Plasma vitamin E and TBA concentrations in rats fed the high-cholesterol diets of the different levels of Vit. E supplemented with naringin or hesperidin. ^{abcd} Values not sharing a common superscript are significantly different among groups at $p < 0.05$. ^{NS} Values sharing a common superscript are significantly different among groups at $p < 0.05$.

8. Fecal sterols 배설

체내 스테롤을 체외로 제거하는 수단인 분변 스테롤의 배설량을 측정하기 위해 분변에서 중성 스테롤(coprostanol, coprostanone, cholesterol) 함량과 산성 스테롤인 bile acid의 배설량을 조사하였다. Table 24는 수집된 분변 시료를 중성 스테롤은 GC로, bile acid는 효소법으로 각각 분석한 결과이다. 하루 평균 분변량에 있어서 대조군과 hesperidin군에 비해 naringin군의 경우 유의적으로 낮게 나타났다. 그러나, flavonoid 보충군들의 각 분변 중성 스테롤의 배설량은 각 대조군에 비해 대부분 감소 경향을 보였다. Coprostanol의 경우 식이 Vit. E 수준 증가에 의해서 감소 경향이 나타났는데 low-E 대조군에 비해 normal-E naringin군의 배설량이 유의적으로 낮았다. Cholesterol과 coprostanone을 더한 양에서는 두개의 naringin군들이 식이 Vit. E 수준에 관계없이 유의적으로 낮은 수치를 보였고 normal-E hesperidin군을 제외한 모든 식이군들이 대조군에 비해 낮았다. 따라서, 각 식이군의 총 중성 스테롤 배설량은 naringin의 경우 감소 경향을 보였지만 Vit. E 보충수준에 따른 차이는 없었고, flavonoid 첨가에 의한 배설량 감소는 유의적으로 나타났다. 한편 총 중성 스테롤 배설량은 두 대조군을 제외한 모든 flavonoid 보충군들이 유의적으로 낮게 나타나 이들 수치가 식이 Vit. E 수준에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. Total bile acid 함량은 naringin군에서 유의적인 감소를 나타내었고 그 외 식이 Vit. E 수준에 따른 차이는 없었다.

동물실험 IV에서는 감귤피 추출물과 citrus bioflavonoid의 efficacy test를 대추 및 대추추출물과 혼합하여 수행한결과 이들 물질들이 동맥경화유발 지표를 감소시킴을 확인하였다. 동물실험 V에서는 citrus bioflavonoid인 naringin, hesperidin과 인삼분말의 혈중 콜레스테롤 강화효과 기작 규명을 항산화역할과 관련하여 시험한 결과, 이들 citrus bioflavonoid들이 low vitamin E diet에 보충되었을때도 콜레스테롤 저하작용을 나타냄으로서, citrus bioflavonoid의 콜레스테롤 합성 저해능외에 항산화작용을 통한 지질 저하작용을 밝히게 되었다. 이들의 항산화작용은 antioxidant들을 다량 포함한 것으로 알려진 인삼에 비해서 높게 나타났다.

Table 24. Effects of naringin and hesperidin supplementations on extraction of fecal neutral sterols and total bile acids in rats fed the high-cholesterol diets with different levels of Vit. E

Sterols	Low Vit. E			Normal Vit. E		
	Control	Naringin	Hesperidin	Control	Naringin	Hesperidin
Feces (g/day)	1.28 ±0.09 ^a	1.10 ±0.09 ^{bc}	1.38 ±0.10 ^a	1.22 ±0.08 ^{ab}	0.86 ±0.09 ^c	1.33 ±0.09 ^a
Coprostanol (mg/day)	44.49 ±5.3 ^a	32.17 ±4.54 ^{ab}	29.91 ±4.69 ^{ab}	34.46 ±4.85 ^{ab}	28.38 ±4.59 ^b	30.85 ±2.70 ^{ab}
Coprostanone + Cholesterol (mg/day)	350.37 ±12.88 ^a	218.80 ±14.66 ^b	279.20 ±20.95 ^{bc}	288.95 ±29.83 ^c	227.71 ±19.03 ^b	295.53 ±14.61 ^{ac}
Total neutral sterol (mg/day)	400.30 ±13.19 ^{ab}	247.42 ±16.78 ^{cd}	308.36 ±24.88 ^{ce}	334.14 ±33.75 ^{be}	237.40 ±23.38 ^d	322.55 ±15.42 ^e
Bile acid (mg/day)	1.84 ±0.12 ^a	1.10 ±0.11 ^b	1.55 ±0.16 ^{ac}	1.60 ±0.14 ^{ac}	1.05 ±0.11 ^b	1.40 ±0.12 ^{bc}
Total fecal sterol (mg/day)	402.13 ±13.20 ^a	248.59 ±16.87 ^b	309.92 ±25.03 ^c	335.75 ±36.49 ^c	238.44 ±23.46 ^b	323.97 ±14.77 ^c

¹ Mean ± S.E

^{abcd} Values not sharing a common superscript are significantly different among groups at p<0.05.

제 7 절 Cinnmate derivatives와 타 bioflavonoid들 (rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, tannin)의 혈중 콜레스테롤 강하 기능 (동물실험 VI)

1. Cinnmate의 다양한 유도체가 혈장 지질농도에 미치는 영향

Cinnmate 유도체들 가운데 혈장 콜레스테롤 저하효과를 나타낸 성분은 Table 25에 제시된바와 같이 3,4-dihydroxy cinnamate군(117.7 mg) 4-hydroxy hydrocinnmate

군(101.6 mg/dl)이 대조군(134.9 mg/dl)에 비해 각각 2.7%와 24.7%씩 유의적으로 감소되었다($p < 0.05$). 이에 비해 혈장 중성지방 수준은 모든 cinnamate 유도체 (4-hydroxy hydrocinnamate, 3,4-dihydroxy cinnamate, 3,4-dihydroxy hydrocinnamate, cinnamate)를 투여한 식이군들이 대조군에 비해 낮은 경향을 보였다. 한편 혈장 HDL 콜레스테롤 농도는 대조군이 가장 낮았으며 cinnamate군과 4-hydroxy hydrocinnamate군이 유의적으로 상승된 것으로 나타났다($p < 0.05$). 총 콜레스테롤에 대한 HDL 콜레스테롤의 퍼센트는 4-hydroxy hydrocinnamate(56.2%)군만이 대조군(28.0%)에 비해 유의적으로 증가되었으며($p < 0.05$) 나머지 cinnamate derivatives군들에서는 감소 경향을 보였다. Lovastatin의 투여는 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐에서 혈장 지질농도 개선에는 별 효과가 없었으며 이현상은 타 연구 보고와 일치함을 보였다. 종합적으로 본 혈장 지질대사 개선면에서는 4-hydroxy hydrocinnamate 투여에 의한 지질 저하작용이 가장 우수하며 그 다음은 3,4-dihydroxy cinnamate로 평가되었다.

Table 25. Effects of supplementation of cinnamate derivatives in plasma lipid concentration in rats fed high-cholesterol diets

Group	Concentration of Plasma Lipids (mg/dl)			
	Total Cholesterol	Tri-glycerides	HDL-Cholesterol (% of HDL-C)	Athero. Index
High-cholesterol (HC) control	134.9 ± 5.8 ^b	97.6 ± 5.3 ^a	37.8 ± 2.1 ^b (28.0% ^b)	2.57
HC + 4-(OH)-hydrocinnamate	101.6 ± 6.0 ^c	95.3 ± 5.2 ^a	57.1 ± 3.4 ^c (56.2% ^c)	0.78
HC+3,4-di(OH)-Cinnamate	117.7 ± 5.9 ^a	80.6 ± 5.7 ^a	38.8 ± 2.5 ^b (33.0% ^b)	2.03
HC + 3,4-di(OH)-hydrocinnamate	126.8 ± 4.4 ^{ab}	94.3 ± 4.5 ^a	44.9 ± 3.7 ^b (35.4% ^b)	1.82
HC + Cinnamate	130.7 ± 6.8 ^b	80.6 ± 4.3 ^a	51.9 ± 3.9 ^c (39.7% ^b)	1.52
HC + Lovastatin	130.9 ± 5.1 ^b	110.8 ± 5.9 ^a	39.7 ± 2.4 ^b (30.3% ^b)	2.30

^{abcde}Means in the same column sharing a common superscript are not significantly different ($p < 0.05$).

2. Rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, tannin의 보충이 혈장 지질농도에 미치는 영향

Rutin, quercetin dihydrate, gallic acid 및 tannin의 보충이 혈장 지질농도 변화에 미치는 영향은 Table 26과 같다. 총 콜레스테롤 농도는 모든 flavonoid군들(rutin, quercetin dihydrate, gallic acid 및 tannin)이 대조군과 lovastatin군에 비해 유의적으로 감소되었다($P < 0.05$). 중성지질 농도도 총 콜레스테롤과 마찬가지로 모든 flavonoid 식이군들(rutin, quercetin dihydrate, gallic acid 및 tannin)이 대조군과 lovastatin군에 비해 유의적으로 감소된 결과를 보였다 ($P < 0.05$). HDL-콜레스테롤 수준은 cholesterol-free control군과 cholesterol-free pellet군에서 제일 높았고 flavonoid 투여에 의해 영향을 받지 않았다. 한편 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤의 농도비율은 quercetin dihydrate와 tannin 보충군이 나머지 식이군들에 비해 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 혈장 지질 profile의 전체적인 평가에서는 tannin과 quercetin dihydrate의 보충이 혈장 콜레스테롤, 중성지질, 및 HDL-콜레스테롤 수준의 개선에 가장 우수한 효과가 있었으며, 그 다음은 gallate, rutin, lovastatin의 순으로 평가되었다.

Table 26. Effects of supplementation of rutin, quercetin dihydrate, gallic acid & tannin in plasma lipid concentrations in rats fed high-cholesterol diets

Group	Concentration of Plasma Lipids (mg/dl)			
	Total Cholesterol	Tri-glycerides	HDL-Cholesterol (% of HDL-C)	Athero. Index
High-cholesterol (HC) control	134.9 ± 5.8 ^b	97.6 ± 5.3 ^a	37.8 ± 2.1 ^b (28.0% ^b)	2.57
HC + Rutin	107.3 ± 6.3 ^a	77.6 ± 3.2 ^b	35.7 ± 1.9 ^b (33.3% ^b)	2.01
HC + Quercetin dihydrate	95.1 ± 4.8 ^a	80.5 ± 3.6 ^b	40.7 ± 3.2 ^b (42.8% ^c)	1.34
HC + Gallate	92.7 ± 5.3 ^a	76.9 ± 2.7 ^b	31.9 ± 2.2 ^b (34.4% ^b)	1.90
HC + Tannin	87.5 ± 4.3 ^a	75.5 ± 3.6 ^b	37.3 ± 2.5 ^b (42.6% ^c)	1.35
HC + Lovastatin	130.9 ± 5.1 ^b	110.8 ± 5.9 ^a	39.7 ± 2.4 ^b (30.3% ^b)	2.30

^{abcd}Means in the column row sharing a common superscript are not significantly different ($p < 0.05$).

3. Cinnamate의 다양한 유도체가 간의 HMG-CoA reductase, ACAT 활성도에 미치는 영향

Cinnamate 유도체가 콜레스테롤 항상성 조절에 관여하는 간조직의 HMG-CoA reductase 와 ACAT 활성도에 미치는 작용은 Table 25에 제시하였다. HMG-CoA reductase 활성도는 cinnamate derivative군들중 4-hydroxy hydrocinnamate군을 제외한 3,4-dihydroxy cinnamate군과 3,4-dihydroxy hydrocinnamate군 및 cinnamate군이 고콜레스테롤 대조군(188.5 pmole/mg protein/mg)과 lovastatin군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 이와는 대조적으로 HMG-CoA reductase가 비교적 높게 나타난 lovastatin군과 4-hydroxy hydrocinnamate군의 ACAT 활성도는 대조군(255.3 pmole/mg protein/mg)보다 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). ACAT 활성도가 가장 낮은 cholesterol-free pellet군들과 cholesterol-free control군의 HMG-CoA reductase 활성도는 가장 높게 나타났다. 즉, 이들 두 식이군은 cholesterol-free 식이를 취한 결과, 체내 콜레스테롤 생합성은 매우 활발하였으나 전체적인 생성량은 간에 축적될 만큼의 지나친 양은 아닌 것으로 평가되었다.

상기 결과로 보아 cinnamate derivative군 식이에 보충시킨 4-hydroxy hydrocinnamate의 콜레스테롤 대사 조절 기작은 나머지 cinnamate derivative와 다른 것으로 유추된다. 이에 대한 hypothetical mechanism중의 하나는, 4-hydroxy hydrocinnamate의 보충은 소장에서의 cholesterol 흡수를 저해하는 동시에 간의 콜레스테롤 합성 증가를 유도하되, 전체적인 net effect는 혈중 총 콜레스테롤 수준을 저하시키고 HDL-콜레스테롤 합성은 증가시키는 방향으로 작용한다고 볼 수 있다.

Table 25. Effects of supplementation of cinnamate derivatives in hepatic HMG-CoA reductase and ACAT in rats fed high-cholesterol diets.

Group	Hepatic Enzyme Activities	
	HMG-CoA reductase (pmoles/mg protein/min)	ACAT (pmoles/mg protein/min)
Chol-free Control	252.9 ± 18.0 ^a	188.1 ± 8.6 ^a
High-cholesterol (HC) control	188.5 ± 11.0 ^b	255.3 ± 9.7 ^b
HC + Lovastatin	230.3 ± 12.3 ^a	177.3 ± 14.6 ^a
HC + 4-(OH)-hydrocinnamate	203.6 ± 21.9 ^{ab}	212.2 ± 15.2 ^{ac}
HC + 3,4-(OH)-cinnamate	105.1 ± 9.6 ^c	238.3 ± 16.7 ^{bc}
HC + 3,4-di(OH)- hydrocinnamate	75.5 ± 4.6 ^c	269.6 ± 20.9 ^b
HC + Cinnamate	105.4 ± 8.0 ^c	265.4 ± 16.5 ^b
Chol-free Pellet	255.4 ± 20.9 ^a	108.1 ± 8.3 ^d

4. Rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, tannin의 보충이 간의 HMG-CoA reductase 와 ACAT 활성도에 미치는 영향

다양한 flavonoid들이 콜레스테롤 항상성 조절에 관여하는 HMG-CoA reductase와 ACAT 활성도에 미치는 영향은 Table 26에 제시하였다. Quercetin dihydrate군(143.1 pmole/mg protein/mg)와 tannin군(144.2 pmole/mg protein/mg)은 대조군(188.5 pmole/mg protein/mg)과 나머지 식이군에 비해 HMG-CoA reductase 활성도가 낮았으며, 이와 동시에 ACAT의 활성도도 대조군에 비해 유의적으로 낮았다.

HMG-CoA reductase 활성도가 가장 높게 나타난 군은 콜레스테롤이 전혀 보충되지 않은 cholesterol-free control군과 cholesterol-free pellet군이며, 이군들의 ACAT 활성도는 대조군에 비해 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 한편 ACAT 활성도 비교결과에서는 콜레스테롤 대조군이 나머지 모든군들에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, 이중 quercetin dihydrate와 tannin 보충군의 HMG-CoA reductase 활성도도 동시에 낮아진 것으로 관찰되었다.

Table 26. Effects of supplementation of rutin, quercetin dihydrate, gallic acid & tannin in hepatic HMG-CoA reductase and ACAT in rats fed high-cholesterol diets.

Group	Hepatic Enzyme Activities	
	HMG-CoA reductase (pmoles/mg protein/min)	ACAT (pmoles/mg protein/min)
Chol-free Control	252.9 ± 18.0 ^a	188.1 ± 8.6 ^{ac}
High-cholesterol (HC) control	188.5 ± 11.0 ^{bc}	255.3 ± 9.7 ^b
HC + Lovastatin	230.3 ± 12.3 ^{ac}	177.3 ± 14.7 ^{at}
HC + Rutin	221.7 ± 19.6 ^{ac}	213.4 ± 15.9 ^c
HC + Quercetin dihydrate	143.1 ± 10.0 ^d	128.2 ± 4.9 ^{dc}
HC + Gallate	177.1 ± 10.3 ^{bd}	147.7 ± 12.5 ^{et}
HC + Tannin	144.2 ± 12.2 ^d	148.9 ± 10.9 ^{et}
Chol-free Pellet	255.4 ± 20.9 ^a	108.1 ± 8.3 ^d

상기 효소활성도 분석결과를 비교해볼 때, 이들 bioflavonoid들의 콜레스테롤 개선효과는 quercetin dihydrate와 tannin의 보충에 의한 가능한 작용 기작은 전술한 4-hydroxy hydrocinnamate와는 다르며, 3,4-dihydroxy hydrocinnamate와 유사한 것으로 평가된다. 즉 이들 3가지 bioflavonoid(quercetin dihydrate, 4-hydroxy hydrocinnamate, 3,4-dihydroxy hydrocinnamate)의 보충은 HMG-CoA reductase를 우선적으로 저해하여 콜레스테롤 생합성을 줄이면서 그 net effect는 혈중 총 콜레스테롤을 감소시키는 방향으로 작용하는 것으로 사료된다.

5. Cinnamate의 다양한 유도체와 rutin, quercetin dihydrate, gallate의 tannin의 보충이 간의 항산화효소 활성도에 미치는 영향

Cinnamate derivative에 속하는 bioflavonoid와 rutin, quercetin dihydrate,

gallate, taninin의 보충이 보충이 간조직의 catalase와 glutathione peroxidase(GPx) 활성도에 미치는 영향은 Fig. 14 및 Fig. 15와 같다. 3,4-dihydroxy cinnamate와 cinnamate의 보충은 catalase 활성도를 나머지군에 비해 증가시켰으며 (Fig. 14, $p < 0.05$), cinnamate의 보충은 GPx 활성도를 감소시켰다(Fig. 15). 이때 3,4-dihydroxy cinnamate와 cinnamate의 작용기작은 알수없지만 혈중 총 콜레스테롤 농도저하와 HDL-콜레스테롤 농도증가와 연관이 있는 것으로 보인다. 콜레스테롤 대사 개선에 가장 우수한 효능을 보인 4-hydroxy hydrocinnamate의 보충은 이들 두가지 항산화효소의 활성도에 전혀 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 따라서, 이들 bioflavonoid들의 구체적인 항산화작용은 별도의 *in vivo* 연구에서 다루어야 할 것으로 사료된다.

Catalase 활성도는 rutin, quercetin dihydrate, gallate 및 tannin군간에 전혀 차이가 없었으며, Gpx의 활성도는 rutin, quercetin dihydrate, gallic acid, tannin군들이 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 15) 이들 4가지 bioflavonoid들중 quercetin dihydrate와 tannin의 보충은 앞서 혈장지질 profile에서 관찰된 것처럼 총 콜레스테롤의 감소, HDL-콜레스테롤의 증가 및 중성지질의 감소작용 등을 나타냈을 뿐만 아니라, 간에서는 HMG-CoA reductase 활성도를 저해한 것으로 분석되었다. 따라서 quercetin dihydrate와 tannin의 작용에 대해서는 향후 연속적인 연구수행이 요구되는 바이다.

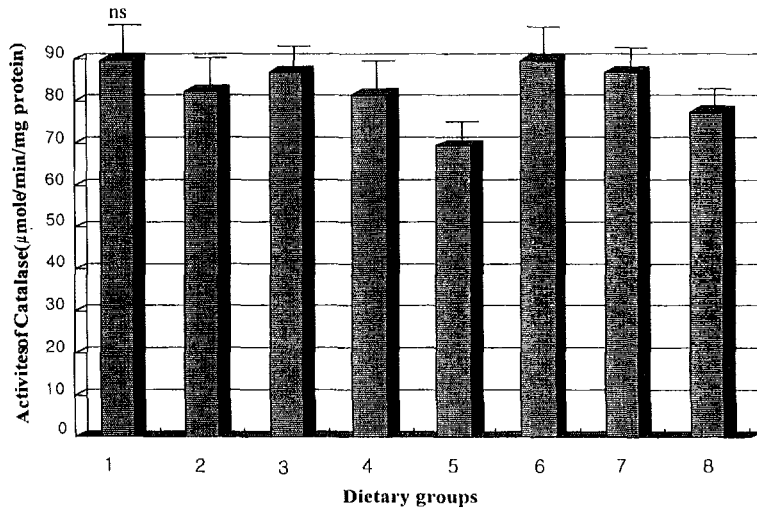
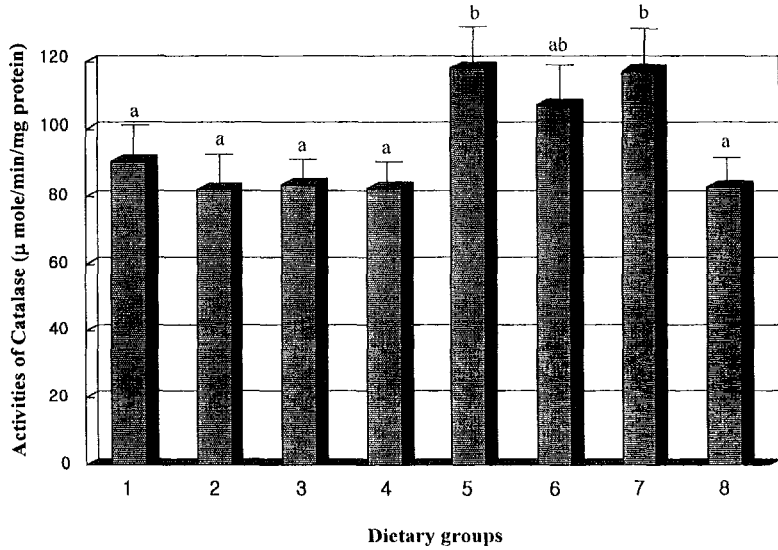


Fig. 14. Effects of supplementation of cinnamate derivatives in hepatic catalase activities in rats fed high-cholesterol diets. (Groups for top figure: 1: cholesterol-free control, 2; high-cholesterol(HC) control, 3; HC+lovastatin, 4; HC+4-hydroxy hydrocinnamate, 5; HC+3,4-dihydroxy cinnamate, 6; HC+3,4-dihydroxy hydrocinnamate, 7; HC+cinnamate, 8; cholesterol-free pellet, Groups for bottom figure: 1: normal control, 2; high-cholesterol control, 3; HC+lovastatin, 4; HC+rutin, 5; HC+quercetin dihydrate, 6; HC+gallate, 7;HC+tannin , 8; cholesterol-free pellet)

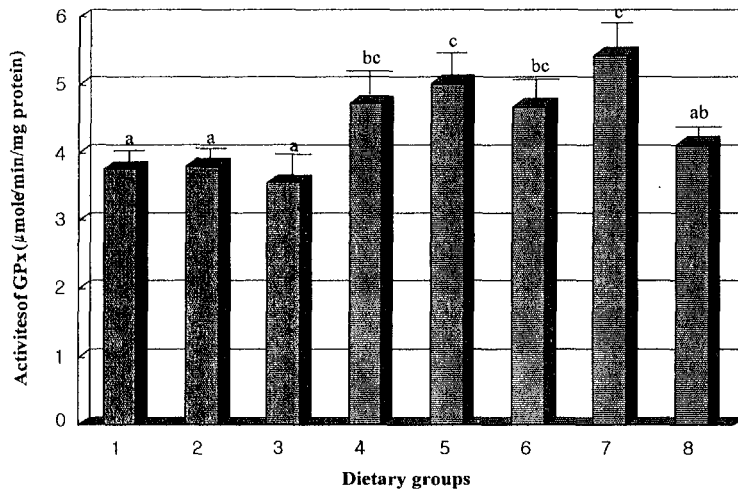
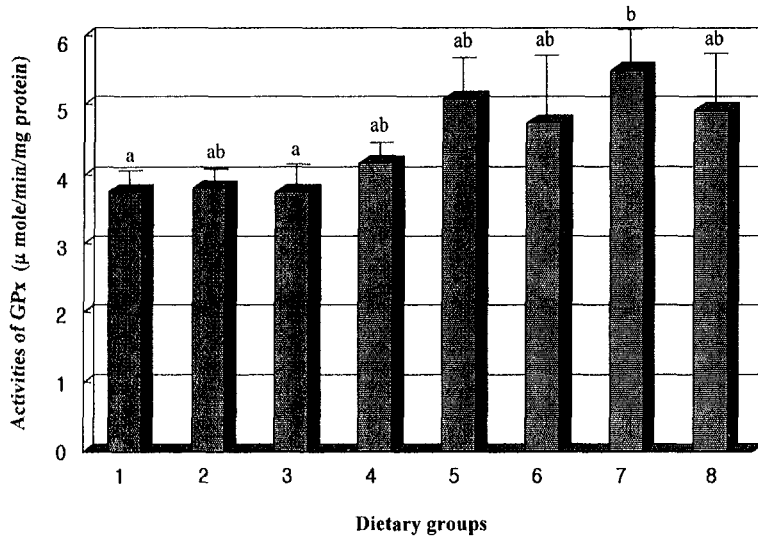


Fig. 15. Effects of supplementation of cinnamate derivatives in hepatic glutathione peroxidase activities in rats fed high-cholesterol diets. (Groups for top figure: 1; cholesterol-free control, 2; high-cholesterol(HC) control, 3; HC+lovastatin, 4; HC+4-hydroxy hydrocinnamate, 5; HC+3,4-dihydroxy cinnamate, 6; HC+3,4-dihydroxy hydrocinnamate, 7; HC+cinnamate, 8; cholesterol-free pellet, Groups for bottom figure: 1; normal control, 2; high-cholesterol control, 3; HC+lovastatin, 4; HC+rutin, 5; HC+quercetin dihydrate, 6; HC+gallate, 7;HC+tannin , 8; cholesterol-free pellet)

여 백

제 4 장 참고문헌

Erickson, S. K., Schrewsbery, M. A., Brooks, C. and Meyer, D. J. (1980) "Rat liver acyl-coenzyme A : cholesterol acyl transferase: its regulation in vivo and some of its properties in vitro" J. Lipid Res. 21:930-941.

Friedwald, W. T. Levy R. I., Fredrickson, D. S. (1972) "Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge" Clinical Chemistry 18:499-502.

Gotterfried, S. P. and Rosenburg. B. (1973) "Improved manual spectrophotometric procedure for determination of serum triglyceride." Clinical Chemistry 19:1077-1081.

Grundy, S. C., Ahrens, E. H. and Miettinen, T. A. (1965) "Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total fecal bile acids." Journal of Lipid Research 6:397-410

Hajjar, D. P., Falcone, D. J., Fowler, S., Minick, C., R. (1981) "Endothelium modifies the altered metabolism of the injured aortic wall." American Journal of Pathology 102:28-29

Harrison, E. L. (1988) "Bile salt-dependent, neutral cholesteryl ester hydrolase of rat liver: Possible relationship with pancreatic cholesteryl ester hydrolase. Biochem. Biochim. Acta 963:28-34

Haug, A., Hostmark, K. T., and Spydevold, O. (1985) "Plasma lipoprotein distribution, fecal cholesterol excretion, and activities of lipoprotein lipase, and lecithin:cholesterol acyltransferase in rats fed diets rich in sucrose of sunflower oil." Acta Physiol. Scand. 125:609-617

Horobin, R. W. Histochemistry and the light microscope. (1989) "In light microscopy in biology." pp137-162. IRL press.

Luft, J. H. (1978) "Improvement of epoxy resin embedding method" Am. J. Pathol. 93:526-617

Junker, L. H., and Story, J. A. (1985) "An improved assay for cholesterol 7 α -hydroxylase activity using phospholipid liposome solubilized substrate." Lipids 20:712-718

Ness, G. C., Eales, S. J., Pendleton, L. C. and Smith, M. (1985) "Activation

of rat liver microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by NADPH." *Journal of Biological Chemistry* 260:12391-12392.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yogi, K. (1979) "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction" *Anal. Biochem.* 95:351-

Reynolds, E. S. (1963) "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque strain in electron microscopy" *J. Cell. Biol.* 17:208-212

Rojas, C. J. and Harrison, E. H. (1993) "Bile Salt-dependent and Bile Salt-independent Cholesteryl Ester Hydrolase Activities in Rat Liver Cytosol" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206:6068

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) "Molecular cloning" 2nd Edition, Book 1, section 7.39

Takayma, M., Itoh, S., Nagasaki, T. A. (1977) "A new enzymatic method for determination of serum choline-coline phospholipids" *Clinical Chemistry Acta.* 79:93-98

Winterbourn, C. C., R. E. Hawkins, M. Brain, and R. W. Carrell (1975) "The estimation of red cell superoxide dismutase activity" *J. Lab. Clin. Med.* 85:337-

Alexander B, Spers GM. Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek horseradish, red redish, and red cabbage tissues. *J Agric Food Chem* 33(2) : 226-228, 1985

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Res* 59 : 527-605, 1979

DeWhalley CV, Rankin S, Hault JRS, Jessupw, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low lipoprotein by macrophages, *Biochem pharmacol* 39 : 1743 - 1750, 1990

Eun JB, Kim MK, Woo HJ, Lee SR, Woo GJ. Development and functional evaluation of bioflavonoids and dietary fibers from Korean fruits. Report on 96 research project supported by a grant from the Ministry of health and welfare, Republic of Korea. 5-16, 1997

Eun JB, Jung YM, Woo GJ. Identification and Determination of Dietary Fibers and Flavonoids in Pulp and Peel of Korean Tangerine, *Korean J Food Sci Technol* 28(2) : 371-377, 1996

Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen A, Forestierie AM, Trovato A, Tripodo MM. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoids(note I) : anti-inflammatory and analgesic activity. *Farco* 40 : 709~712, 1994

Gillies PJ, Rathgeb KA, Perri MA and Robinson CS. Regulation of Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase activity in normal and atherosclerotic rabbit aortas: role of a cholesterol substrate pool. *Experimental and Molecular Pathology* 44 : 329~339, 1986

Goldstein JL, Kita T, and Brown MS. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. *New Engl J Med* 309 : 288~296, 1983

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low density lipoprotein receptors : implication for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 76 : 504~507, 1987

Ham SS, Choi KP, Choi YS, Lee SY. Studies on antimutagenic and lipotropic Action of Flavonoids of Buckwheats. *J Korean Soc Food Nutr* 23(4) : 698-703, 1994

Han SS, You IJ. Studies on Antimicrobial Activities and Safety of Natural Naringin in Korea. *Kor J Micol* 16(1) : 33-40, 1988

Harborne Jeffrey B. Flavonoids in the environment : structure-activity relationships. *Prog Clin Biol Res* 280 : 17~27, 1988

Harman D. Nutritional implication of the free radical theory of aging. *J Am College Nutr* 1 : 27, 1982

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40 : 2379-2383, 1992

Igor BA, Anatolli ID, Alexander VB, Vladmir AK, Alla IP. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38(11) : 1763~1769, 1989

Isabelle M, Gerarad L, Pascale C, Odile S, Nicole P, Pierre B, Pierre C, Josiane C. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diometin on iron-loaded rat hepatocytocultuers. *Biochem Pharmacol* 45(1) : 13~19, 1993

Isabelle M, Gerarad L, Pirre C, Josiane C. Role of flavonoids and iron chelation in antiowidant action. *Meth Enzymol* 234 : 437~443, 1994

- Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K and Uchino K. Hesperidin as an inhibitor of lipase from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Biosci iotechnol Biochem* 61 : 102~104 1997
- Marie HS, Joel L, Marie C, Canivenc L, Patric R, Marc S. Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol Appl pharmacol* 130 : 73~78, 1995
- Martin KR, Failla MI, Smith JC. β -carotene and leutein protect HepG₂ human liver cells against oxidant-induced damage. *J Nutr* 126 : 2098~2106, 1996
- Miranda JL, Patricia JE, Michele AM, Hoult JRS, Barry H. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem pharmacol* 42(9) : 1673~1681, 1991
- Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM and LoCurto RB. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid(note II) : hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rats. *Farmaco* 50 : 595~599, 1995
- Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymatic lipid peroxidation. *Biochem pharmacol* 40 : 793~797
- Packer L. The role of anti-oxidative treatment in diabetis melitus, *Diabetologia* 36 : 1212~1213, 1993
- Park JC, Chun SS, Young HS, Kim SH. Studies on the chemical components and biological activities of edible plants in korea(II). *J Korean Soc Food Nutr* 22(5) : 581~585, 1993
- Rafat Husain S, Josiane Cillard, Pierre Cillard. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem* 26 : 2489~2491, 1987
- Robak J, Gryglewski RJ. Flavlnoids are scavengers of superoxide anion. *Biochemical Pharmacology* 37(5) : 837~841, 1988
- Schroepfer GJ, Jr. Sterol biosynthesis. *Ann.Rev. Biochem.* 51 : 555~585, 1982
- Shapiro DJ, Nordstrom JL, Mitschelen JJ, Rodwell VW and chimke RT. Micro assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver and in L-cell fiblasts. *Biochem. Biophys. Acta* 370: 369~377, 1974
- Schonfeld G : Disorders of lipoprotein transport. *In DeGroot LJ(eds):*

Endocrinology(2nd eds) Philadelphia, WB Saunders Company, 2424~2453, 1989

Sies H, Krinsky NI. Antioxidant vitamins and β -carotene in disease prevention. *Am J Clin Nutr* 62 : 1299~1540, 1995

Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. Isolation, Purification and Hypotensive Effects of Bioflavonoids in Citrus sinensis. *J Korean Soc Food Nutr* 21(2) : 136~142, 1992

Steel RGD and Torrie JH. Principles and procedures of statistics. *McGraw Hill*, New York, 1960

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol, Modification of Low-Density Lipoprotein that increase it, Atherogenicity. *N Engl J Med* 320 : 915~924, 1989

Stryer. *Biochemistry*. 1987

여 백

부 록

부록 1. 실험재료 및 방법

1. 시료 수집

사육기간 중 마지막 3일 동안 동물들의 분변을 수집하여 건조시킨 후 시료 분석시까지 -20°C 에서 보관하였다. 사육기간이 끝나는 날 15시간 절식시킨 후 에테르와 근육 주사($75\text{ mg/kg body weight}$)로 마취시키고 복부 하대 정맥(inferior vena cava)으로부터 혈액을 채취하여 $3,000\text{ rpm}$, 4°C 에서 15분간 원심분리로 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 -20°C freezer에 보관하였다. 동물들의 장기조직은 적출 후 PBS(phosphate buffered saline)용액으로 여러 번 헹궈낸 후 물기를 없애고 칭량한 후 그 중 일부를 효소 활성도 측정용, 조직 지질 정량용으로 각각 분리 수집하여 액체 질소에 급냉 시켰다가 -70°C 에 보관하였다.

2. 혈장지질 분석

혈장은 총 콜레스테롤(TC), HDL-cholesterol, triglyceride(TG)의 농도 측정에 사용되었다.

가. Total-cholesterol 정량

혈장 중에 있는 콜레스테롤 정량은 Allain 등(1974)의 enzymatic method에 따라 측정용 시액(아산 제약 kit)을 사용하였다. Ester형 cholesterol로부터 전환된 유리콜레스테롤을 cholesterol oxidase에 의해 Δ^4 -cholestenon으로 전환시키고 phenol과 4-amino-antipyrine에 의해 적색으로 발색시켜 492 nm (Beckman 650 spectrophotometer)에서 흡광도를 측정하여 콜레스테롤 표준액(300 mg/dl)과 비교하여 농도를 계산하였다.

나. HDL-cholesterol 정량

혈장 lipoprotein 중 HDL-cholesterol은 dextransulfate- MnCl_2 침전법(Warnick, 1982)에 의해 LDL 및 VLDL-cholesterol을 침전시킨 후 분리하여 Total-cholesterol

정량과 동일한 방법으로 정량하였다.

다. Triglyceride 정량

중성지방의 농도는 McGowan 등(1983)의 착색법 원리에 의해 중성지방 측정용 시액(아산 제약 kit)을 사용하였다. Lipoprotein lipase를 이용하여 중성지방을 glycerol로 분해시킨 후 glycerol kinase와 glycerophosphoxidase 첨가로 H₂O₂를 발생시킨다. 여기에 peroxidase 첨가로 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 읽은 다음 글리세롤 표준액(300 mg/dl)과 비교하여 농도를 계산하였다.

3. 간조직의 cholesterol과 triglyceride 함량 측정

간조직 지질은 Folch 등(1957)의 방법에 의해 추출하였고 cholesterol과 triglyceride 함량은 Sale 등(1983)의 방법을 수정하여 측정하였다. 간조직 0.5 g을 잘게 자른 후 5 ml chloroform : methanol (2 : 1) 용액으로 균질화 시키고 Whatman #1 여과지로 걸러낸다. 동량으로 다시 한번 걸러내고 추출액을 60°C에서 질소 가스로 휘발시켜 chloroform : methanol (2 : 1) 1 ml에 녹인 후 100 μ l를 취하여 다시 질소 가스로 말린다. Ethanol로 희석한 후 지질정량을 위해 효소 시액에 유화제로 3 mM cholic acid(sodium salt)와 발색시 일어나는 탁도(turbidity)를 제거하기 위하여 0.5% Triton X-100을 혼합하여 cholesterol과 triglyceride 농도를 정량하였다.

4. Hepatic HMG-CoA reductase 활성도 측정

간조직의 콜레스테롤 조절효소인 HMG-CoA 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 활성도를 측정하였다. 먼저 Hulher 등(1973)의 방법을 수정 보완하여 간조직으로 부터 효소원인 microsome을 분리해냈다. 적출된 간 2 g을 6 ml의 0.1 M triethanolamine · HCl, 0.02 M EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid, pH 7.4), 2 mM DTT(dithiothreitol) 완충용액에서 분쇄시킨 후 각각 10,000×g와 12,000×g에서 15 분간 원심분리하여 세포 찌꺼기층을 제거시켰다. 그 상층액을 다시 취하여 100,000×g에서 1시간 초원심분리한 후 상층액은 버리고 pellet을 취해 완충용액으로 현탁·세척시킨 후 100,000×g에서 1시간 초원심분리하였다. 이때 생긴 침전물을 1 ml 완충용액에 녹여 얻은 microsome 분획을 효소 활성 분석용으로 vial에 각각 나누어 수집한 후 -70°C에 보관하였다.

분리한 microsome은 Bradford 방법(1976)을 이용하여 단백질 정량 (100~200 μ g protein/10 μ l)한 후 [¹⁴C]HMG-CoA를 기질로 한 Shapiro 등(1974)의 방법을 수정 보완

하여 HMG-CoA reductase 활성도를 측정하였다. Microsome 10 μ 를 500 nmol NADPH와 50 nmol [14 C]HMG-CoA(specific activity : 5,6980 cpm/nmole)에 혼합하여 전체 반응 부피를 60 μ 로 하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 이 과정에서 cholesterol 생합성의 조절반응인 HMG-CoA의 mevalonate로의 전환이 일어나는데 반응부피의 ¼에 해당하는 10 N HCl을 가하여 15분 후 반응을 종료시킨다. 반응 종료된 혼합액을 10,000×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 Silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate에 점적하여 benzene : acetone(1 : 1, v/v) 용매에서 전개시키고 mevalonate standard와 비교하여 Phospho Image Analyzer (MacBas 1000, Fuji)로 확인 후 그 위치의 band를 잘라 Scintillation counter (Packard Tricarb 1600 TR, Packard, Australia)로 방사선 활성을 측정하였다. 활성도 단위는 microsome 단백질 1 mg이 반응시간 1분당 생성하는 mevalonate양을 pmole로 나타내었다(pmole mevalonate formed/min/mg·microsomal protein).

5. Hepatic Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) 활성도 측정

간조직내 ACAT의 활성도를 측정하기 위해 콜레스테릴 에스테르 중 oleoyl-CoA를 coenzyme으로 이용하는 Gillies 등(1986)의 방법을 수정하여 사용하였다. 콜레스테롤 (1 mg/ml)과 Triton WR-1339(10% in acetone)를 각각 acetone에 녹여 혼합시킨 후 아세톤은 휘발시키고, 다시 물에 희석시킨 콜레스테롤 용액(300 μ g/ml)을 기질로 사용하였다. 1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 20 μ l, 0.6 mM BSA(bovine serum albumin) 10 μ l와 효소원인 50~100 μ g microsome을 혼합하여 물로 180 μ l 채운 후 37°C에서 30분간 전반응 시켰다. 이 반응 용액에 5.62 nmol [14 C]oleoyl-CoA(specific activity : 15,000 cpm/nmole) 20 μ l 첨가로 전체부피 200 μ l가 되게 한 후 다시 37°C에서 30분간 반응시킨다. 그후 반응 종결과 함께 500 μ l의 isopropanol : heptane(4 : 10, v/v)용액과 300 μ l의 heptane 그리고 200 μ l의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 섞은 후 실온에서 2분간 방치해둔다. 최종적으로 cholesteryl [14 C] oleoate가 존재하는 상층액 200 μ l를 취하여 scintillation counter로 측정한 값을 2배로 하여 동위원소 활성도를 보정하였다. 활성도 단위는 microsome 단백질 1 mg이 반응시간 1분간 생성해내는 cholesteryl oleoate의 pmole수(pmole cholesteryl oleoate formed /min/mg microsomal protein)로 나타내었다.

6. 혈장의 과산화 지질 측정

혈장의 지질 과산화물 측정은 Tarlardgis 등(1964)의 방법을 적용하였다. 혈장 0.5

ml에 5% TCA(thiochloroacetic acid) 3 ml, 0.06 M TBA (thiobarbituric acid) 1 ml 를 혼합하여 80°C 수조에서 90분간 가열하여 이를 실온에서 냉각시킨 후 2000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액 흡광도를 535 nm에서 읽는다. MDA (Malondialdehyde) 표준용액은 TMP (tetramethoxy propane)을 50°C waterbath에서 60분간 반응시켜 가수 분해시킨 후 실온으로 냉각시켜 1 ml를 0.01 M Na₃PO₄ buffer(pH 7.0) 99 ml에 희석시켜 1×10⁻⁴M MDA 표준용액을 제조하였다. 267 nm에서 MDA 표준용액의 흡수 스펙트럼을 얻어 extinction coefficient로 부터 정확한 농도를 계산하여 보정한 후 혈장과 동일한 조건에서 반응시켜 TBA-MDA chromophore의 표준곡선을 얻었다. 이 곡선으로부터 TBA 반응 물질의 양을 MDA equivalent로 산출하였다.

7. 혈장 vitamin E 수준 측정

HPLC를 이용한 Bieri 등(1979)의 방법에 따라 혈장의 α -tocopherol을 정량하였다. 혈장 200 μ l에 internal standard로 tocopherol acetate 100 μ l (50 μ g/ml)를 가하여 잘 섞은 후 n-heptane으로 lipid를 추출한 뒤 4°C, 1500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이때 얻은 heptane층은 빛을 차단하기 위해 갈색 vial에 옮기고 heptane으로 한번 더 추출하였다. 수집한 heptane층은 syringe filter(0.5 M FH Membrane)로 여과 하여 새 vial에 옮겨 질소가스로 건조시켰다. 건조된 지질 추출물은 diethyl ether : methanol (1 : 3, v/v)용액 200 μ l에 용해시킨 후 HPLC로 정량하였다. HPLC 분석 조건은 Table 2와 같다.

Table 2. HPLC conditions for plasma vitamin E analysis

Items	Conditions
Column	microBondapack C18
Detection	UV 292 nm
Flow rate	2.5 ml/min
Solvent	Methanol : H ₂ O = 95 : 5
Attenuation	16
Chartspeed	1 cm/min
PT	200

8. Hepatic antioxidative enzyme 활성도 측정

가. 간조직의 효소원 분획 분리

항산화 효소인 SOD(Superoxide dismutase), catalase 및 GSH-Px (Glutathione peroxidase)의 효소원을 분리하기 위해 간 1 g당 5배의 0.25 M sucrose buffer를 넣고 균질화 하여 600×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액과 침전물을 따로 분리하였다. 먼저 pellet은 mitochondria 분획으로서 0.25 M sucrose buffer 2 ml로 현탁시켜 10,000×g에서 20분간 재원심분리하고 침전물에 다시 0.25 M sucrose buffer 2 ml로 현탁하여 E-tube에 옮겨 catalase assay용으로 -70℃에 보관하였고, 위에서 분리된 상층액은 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 세포질 분획인 상층액을 E-tube에 각각 SOD 및 GSH-Px assay용으로 나누어 단백질 정량 한 후 -70℃에 보관하였다.

나. Superoxide dismutase 활성도 측정

SOD 활성도 측정용인 세포질 분획은 지질을 침전시키기 위해 상층액 1 ml당 0.4 ml ethanol : chloroform (25 : 15) 용액을 혼합하여 10,000×g에서 원심분리하여 가라앉히고 cytosol과 가용성 단백질로 구성된 상층액을 얻어 사용하였다. SOD는 superoxide anion radical($O_2^{\cdot -}$)을 H_2O_2 및 O_2 로 분해시키는 반응을 촉매하는 효소로서 Marklund 등(1974)의 방법을 수정 보완하여 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색정도를 이용하여 그 활성도를 측정하였다. Tris-EDTA-HCl buffer(pH 8.5) 1.5 ml에 효소원 0.1 ml와 pyrogallol 용액 0.1 ml를 넣고 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 용액을 50 μ l 넣어 반응을 종결시키고, 420 nm에서 흡광도를 구하였다. 활성도 단위는 pyrogallol의 자동산화를 방해 하는데 필요한 cytosolic protein에 대한 SOD unit로 계산하였다(SOD unit/mg protein).

다. Catalase 활성도 측정

Catalase는 H_2O_2 를 H_2O 및 O_2 로 분해시키는 역할을 하며, 활성 측정은 Aebi 등(1974)의 방법을 수정 보완하였다. 50 mM K.P buffer(K_2HPO_4 : Na_2HPO_4 = 1 : 1.5, pH 7.0) 2.89 ml와 효소원인 mitochondria 분획 10 μ l를 25℃에서 5분간 preincubation한 후 30 mM H_2O_2 용액 0.1 ml를 첨가하여 25℃에서 5분간 240 nm에서 흡광도를 구하였다. 효소 활성도는 1분당 mitochondrial protein 1 mg이 분해시킨 H_2O_2 의 μ mole로 계산하였다(decreased H_2O_2 μ mole/mg protein).

라. Glutathione peroxidase 활성도 측정

Glutathione peroxidase 활성도는 Paglia 등(1967)의 방법을 수정 보완하여 실험하였다. 산화형 glutathione(GSSG)이 NADPH에 의해 환원될 때 NADPH의 흡광도가 340 nm에서 감소하는 것을 측정하였다. 활성도는 0.1 M Tris-HCl(pH 7.2) buffer 2.6 ml에 30 mM glutathione 용액 0.1 ml와 6 mM NADPH, 효소원인 cytosolic 분획 0.1 ml를 섞어 25°C에서 5분간 preincubation 한 후 30 mM H₂O₂를 첨가하여 25°C에서 5분간 incubation한 후 340 nm에서 흡광도를 구하였다. 활성도 단위는 1분당 cytosolic protein 1 mg에 대해 산화된 NADPH μ mole로 계산하였다(oxidized NADPH μ mole/min/mg protein).

9. Fecal neutral sterol 정량

분변의 중성 스테롤, 즉 coprostanol, coprostanone, cholesterol양은 Czubyco 등(1992)에 의한 방법에 따라 건조된 분변을 막자사발에 갈아서 1 g을 취한 후 internal standard로서 1 mg 5 α -cholestane을 첨가하였다. 여기에 1 N NaOH(in 90% ethanol) 10 ml를 가하여 67°C waterbath에서 1시간 동안 mild alkaline hydrolysis를 시킨 후, 실온에서 식힌 다음 물 5ml를 가하고 7 ml cyclohexane으로 세번 추출하였다. 추출된 용액은 질소 가스로 건조시킨 후 cyclohexane으로 희석시켜 GC로 정량하였다. 이 방법은 TLC(thin layer chromatography) 단계와 시료의 메틸화 과정을 생략할 수 있는 간단한 방법이며 GC의 분석 조건은 Table 3과 같다.

Table 3. GC conditions for fecal sterol analysis

Items	Conditions
Column	Supelco SAC TM -5 Capillary column
Detector	Flame ionization detector (FID)
Column temperature	285 °C
Injector temperature	300 °C
Detector temperature	300 °C
Carrier gas(N ₂)	28 ml/min
Attenuation	32
Chatspeed	1 min/cm

10. Total bile acid 정량

분변의 총 bile acid 함량은 Michael 등(1980)의 방법을 보완한 효소법을 사용하여 측정하였다. Neutral sterol extraction에서 얻어진 lower aqueous phase에 10 N NaOH 2 ml를 첨가하여 120°C에서 autoclave 시킴으로써 ester를 alkali로 가수분해 시켰다. 시료용액의 액성을 HCl을 사용하여 pH 2로 맞추고 chloroform : methanol (2 : 1) 용액 40 ml를 혼합하여 1000×g에서 5분간 원심분리 하였다. Aqueous phase를 취해 chloroform 20 ml로 한번 더 추출한 후 vacumm evaporator (Heidolph, vv2000, Deutschland)로 용매를 휘발시켰다. 다시 chloroform : methanol (2 : 1) 용액 25 ml를 첨가하여 1000×g에서 5분간 원심분리로 침전물을 가라 앉힌 후 5 ml 취해 질소가스로 chloroform을 휘발시켰다.

추출된 시료는 methanol : H₂O (5 : 1) 용액 1 ml로 녹인 후 다시 10배 희석한 후 bile acid 정량에 사용하였다. 그 다음 0.2 mmol Glycine/ NaOH buffer(pH 9.4), 0.15 mmol hydrazine hydrate, 0.1 μmol EDTA(ethylenediaminetetracetate), 2.6 μmol NAD를 포함한 반응시약 1 ml에 cholic acid(in methanol)를 표준용액으로 하여 추출한 시료와 함께 각각 50 μl를 취해 잘 섞었다. 각 시료 및 표준 용액을 포함한 시험관에 3α-Hydroxysteroid dehydrogenase 20 μl 첨가하여 1시간 동안 상온에서 incubation시켰다. 이어서 20 μl Triton X-100 첨가로 nonspecific turbidity를 제거한 후 340 nm에서 흡광도를 구하였으며 표준시료와 비교하여 분변의 bile acid 농도를 계산하였다.

11. 통계분석

본 연구의 모든 실험결과는 SPSS package program을 사용하여 각 실험군당 평균치와 표준오차로 나타내었고, 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검증은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하였다. 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의하여 p<0.05 수준에서 검정하였으며(Steel and Torrie, 1960), 변인간의 상호관련성을 보기 위해서는 Pearson's correlation을 적용하였다(Goodnight, 1981).

부록 2. 본 과제의 연구성과

1) 국제 학술지 논문발표실적

Bok, S. H., Lee, S. H., Park, Y. B., Bae, K. H., Son, K. H., Jeong, T. S. and **Choi, M. S.** (1999) "Plasma and Hepatic Cholesterol and Hepatic Activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase and Acyl CoA:Cholesterol Transferase are Lower in Rats fed Citrus Peel Extract or a Mixture of Citrus Bioflavonoids, Journal of Nutrition" Vol 129(6):1282-1185

Shin, Y. W., Bok, S. H., Jeong, T. S., Bae, K. H., Jeoung, N. H., **Choi, M. S.**, and Park, Y. B. (1999) "Hypocholesterolemic Effect of Naringin Associated with Hepatic Cholesterol Regulating Enzyme Changes in Rats" International Journal of Vitamin and Nutrition, Vol. 69(4): 27-31

Lee, S. H., Jeong, T. S., Park, Y. B., Kwon, Y. K., **Choi, M. S.** and Bok, S. H. (1999) "Hypocholesterolemic Effect of hesperetin mediated by inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A:Cholesterol acyltransferase in rats fed high-cholesterol diet" Nutrition Research 19(8):1245-1258

Lee, S. H., Cho, K. H., Bae, K. H., Bok, S. H., Kwon, Y. K., Lee, E. S. and **Choi, M. S.** (1999) "Cholesterol-lowering activity of naringenin via inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase and acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in rats" Annals of Nutrition & Metabolism 43(3): 131-190

Bok, S. H., Shin, Y. W., Bae, K. H., Jeong, T. S., Kwon, Y. K., Park, Y. B. and **Choi, M. S.** (1999) "Effects of naringin and lovastatin on plasma and hepatic lipids in high-fat and high-cholesterol fed rats" Accepted to Nutrition Research.

2) 국제 및 국내 특허 실적

국제출원 :

- (1) Bioflavonoids as HDL increasing agent. Korean Patent Appl. No. 98-43909, PCT/KR98/00326, US patent appl. 1998. 10. 20.
- (2) Citrus peel extract as ACAT inhibitor, macrophage-lipid complex formation inhibitor, liver disease preventing agent, and blood sugar reducing agent, PCT(1998. 10. 20), PCT/KR98/00322, U.S patent appl.
- (3) Naringin, naringenin as ACAT inhibitor, macrophage-lipid complex formation inhibitor, liver disease preventing agent, and blood sugar reducing agent, PCT(1998. 10. 20), PCT/KR98/00323, U.S patent appl.
- (4) Hesperidin and hesperetin as ACAT inhibitor, macrophage-lipid complex formation inhibitor, liver disease preventing agent, and blood sugar reducing agent, PCT(1998. 10. 20), PCT/KR98/00324, U.S patent appl.
- (5) Bioflavonoids as blood sugar reducing agent. PCT(1998. 10. 20) PCT/KR98/00325, US Patent Appl.

국제특허 등록 :

- 1) Hesperidine and Hesperetin as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) Reductase Inhibitor, PCT Patent No. PCR/KR97/00190 (W098/16220) (1998. 6. 9)
- 2) Naringin and naringenin as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA(HMG-CoA) reductase inhibitor, PCT patent No. PCT/KR97/00191 (W098/16221), U.S. patent No. 5,877,208 (1999. 3. 2)
- 3) Citrus peel extract as 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA(HMG-CoA) reductase inhibitor, PCT patent No. PCT/KR97/99192 (W098/16239), U.S. patent No. 5,792,461. (1998, 8. 11)

국내출원 :

- (1) Hesperidin 및 귤껍질추출액을 이용한 HMC-CoA reductase 저해제 개발, 96-045735 (1996)
- (2) 감귤류 과피추출액을 포함하는 아실코에이-콜레스테롤-오르토-아실트랜스퍼라아

- 제 저해제 조성물, 출원 97-55580 (1997)
- (3) 나린진 또는 나린제닌을 포함하는 아실코에이-콜레스테롤-오르토-아실트랜스퍼라제 저해제 조성물, 출원 97-55579 (1997)
- (4) 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 포함하는 아실코에이:콜레스테롤-오르토-아실트랜스퍼레이즈 저해제 조성물, 출원 97-55578 (1997)
- (5) 대추추출물을 포함하는 콜레스테롤 강하 및 콜레스테롤 에스테르 전이 단백질 저해용 조성물, 출원 97-59425 (1997)
- (6) 대추추출물을 포함하는 혈압강하용 조성물, 출원 97-59426 (1997)
- (7) 비타민 씨와 굴피추출농축액을 활성성분으로 하는 3-하이드록시-3-메틸글루타린코에이 환원 활성효소 저해제 조성물, 출원 97-55581 (1997)
- (8) 헤스페리딘을 포함하는 혈압강하용 조성물, 출원 97-59427 (1997)
- (9) 감귤류 과피 추출액을 포함하는 혈압강하용 조성물, 출원 97-59428 (1997)
- (10) A composition of jujube extract and citrus peel extract as a lipid lowering and blood pressure lowering agent. Korean Patent Appl. No. 98-12818 (1998)
- (11) A functional food composition containing citrus peel powder and citrus peel extract. Korean Patent Appl. No. 98-12411, (1998)
- (12) Development of a health beneficial sauce for prevention of chronic disease of adults. Korean Patent Appl. No. 98-12410, (1998)
- (13) Development of Citrus tea of improved function. Korean Patent Appl. No. 98-13285, (1998)
- (14) Hesperidin as a liver disease prevention and treatment agent. Korean Patent Appl. No. 98-10888, (1998)
- (15) Naringin and the naringin containing composition as a liver disease prevention and treatment agent. Korean Patent Appl. No. 98-10889, (1998)
- (16) Citrus juice preparation method with improved functions. Korean Patent Appl. No. 98-13284, (1998)
- (17) Production of health improving functional beverage using citrus peel extract. Korean Patent Appl. No. 98-13283, (1998)
- (18) Naringin and naringenin as prevention and treatment agent for atherogenesis. Korean Patent Appl. No. 98-11450, (1998)
- (19) A bioflavonoid composition with blood glucose lowering activity. Korean

Patent Appl. No. 98-37958, (1998)

- (20) A pharmaceutical and food composition containing rutin and quercetin for cholesterol lowering antiatherogenesis liver disease prevention, and blood sugar lowering. Korean Patent Appl. No. 98-37959, (1998)
- (21) A pharmaceutical, food & beverage composition containing cinnamic acid & derivatives. Korean Patent Appl. No. 98-37960, (1998)
- (22) A pharmaceutical, food & beverage composition containing tannin, gallic acid, and ellagic acid. Korean Patent Appl. No. 98-37961, (1998)
- (23) Diosmin as a cholesterol lowering, macrophage-lipid complex formation inhibitor, and blood sugar lowering agent. Korean Patent Appl. No. 98-37962, (1998)
- (24) Neohesperidin dihydrochalcone as a cholesterol lowering agent, macrophage-lipid complex formation inhibitor, and liver disease prevention agent and the pharmaceutical & food composition. Korean Patent Appl. No. 98-37963, (1998)
- (25) 헤스페리딘을 포함하는 하이드록시메틸글루타릴-코에이 환원효소 활성 저해용 조성물. Korean Patent Appl. No. 99-2189 (1999. 1. 25)
- (26) 나린진을 포함하는 하이드록시메틸글루타릴-코에이 환원효소 활성 저해용 조성물. Korean Patent Appl. No. 99-2202 (1999. 1. 25)

여 백

제 2 위탁연구과제

심혈관 질환의 예방, 치료용 활성물질을 함유한
농산물의 탐색 및 개발에 관한 연구

여 백

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산자원으로부터 심혈관질환 예방, 치료활성 신소재 개발에 관한 연구” 과제 (위탁과제 “심혈관질환의 예방, 치료용 활성물질을 함유한 농산물의 탐색 및 개발에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 1. 5.

위탁연구기관명 : 충남대학교

위탁연구책임자 : 배 기 환

연구 원 : 강 종 성

여 백

요 약 문

I. 제목

심혈관질환의 예방, 치료용 활성물질을 함유한 농산물의 탐색 및 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

일반적으로 사용하는 순환기 치료제는 대부분이 합성의약품이므로 부작용 때문에 효과면에서 한계성을 드러내고 있다. 따라서, 민간요법으로 쓰고 있는 생약으로 부터 신규의약품을 찾으려는 노력이 활발히 진행되고 있다. 이런 목적을 달성하기 위하여는 활성성분을 분리, 구조결정, 유도체합성이 뒤 따라야한다. 뿐만 아니라, 안전성, 체내흡수, 대사 배설 등, 약동력학적 시험, 임상시험 등 각 분야의 전문가가 해당분야에 심혈을 기울여 서로 연계되어야 한다. 87년 물질 특허 도입후 우리나라도 신물질 창출에 지속적인 노력과 투자로 그 가능성이 제품화로 연결할 수 있는 자신감이 대학, 연구소에서 나타나고 있어 신약개발시대에 접어들고 있다. 의약품시장은 정치적, 경제적 안정과 국민수입의 증가, 관련회사의 제조능력, 국민의료보험, 사망원인 등과 밀접한 관계가 있다. 최근 선진국의 약효별 생산순위는 항생물질이 가장 많고, 뒤이어 순환기약, 효소제제, 대사성의약품, 중추신경계약, 소화기관약품으로 되어있고, 국내에서도 생산순위는 항생물질이 가장 많고 순환기약, 소화기관약품, 자양강장 변질제, 중추신경계약, 대사성의약품 순이므로 거의 비슷한 추세이다. 그러나 수요변화는 질병이나 사회 변화에 따라 변할 수 있으며, 사회가 고령화함에 따라 성인병이 증가하고 있다. 특히, 항암제, 순환기용약, 이뇨제, 당뇨병 관련의약품이 늘어나고 있는 추세가 이를 뒷받침한다. 그러므로 민간약으로 쓰고있는 천연자원을 이용하여 신규의약품을 개발하는 일은 약효가 우수하면서 부작용은 적고 거기다 비교적 생산비가 적게 되는 이점이 있다. 이런 목적으로 중국 한의서, 중약대사전 등을 포함한 문헌 정보시스템을 통하여 선정된 생약 중에서 우리나라의 농가에서 재배하는 농산물로부터 표준엑스제조법을 이용하여 추출, 분획, 분리, 정제과정을 거쳐 효능을 검색하므로써 새로운 심혈관 질병의 예방 및 치료용 활성물질을 개발, 농가소득에 이바지하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

제 1차년도: 순환기 치료생약과 약용식물 조사와 선정, 귤피의 유효성분 추출조건 확립

1. 순환기 치료생약과 약용식물 조사

전통적으로 사용되어 온 순환기계 생약들을 동의보감이나 생약교과서 등에서 발췌한 것은 다음과 같다.

- 1). 감귤나무 *Citrus unshiu* Markovich (운향과)
- 2). 산사나무 *Crataegus pinnatifida* var. *typica* Schneider (장미과)
- 3). 오미자나무 *SC Shizandra chinensis* (Turcz.) Baillon (목련과)

2. 귤피의 유효성분 추출 조건

유효성분을 효율적으로 그리고 경제적으로 추출하기 위하여 용매, 온도, 시간을 정하여 실험한 결과 EtOH로 80도에서 4시간 추출하는 것이 바람직하였다.

제 2차년도: 오미자 및 산사나무잎의 성분 분리

오미자와 산사나무는 순환기 치료 생약으로 개발 가능성이 높은 점에 착안하여 유효성분을 분리하고 화학구조를 규명하였다. 오미자로부터는 lignan 계통의 물질을 대량으로 분리할 수 있는 방법을 확립하였고, 산사나무의 잎으로부터는 천연에 새로운 물질을 분리, 화학구조를 규명하였다. 이 식물들은 농가에서 쉽게 재식할 수 있고 부가가치가 높은 농작물이 될 수 있는 점을 감안하여 본 연구에 착수하였다.

제 3차년도: 산사자의 성분 및 재래종 귤피류의 hesperidin과 naringin의 함량 조사

순환기치료제로 개발 가치가 높은 산사자의 성분들을 연구하여 새로운 물질 2개를 분리, 화학구조를 규명하였다. hesperidin을 포함하는 플라보노이드 성분은 감귤 뿐만 아니라 운향과에 속하는 나무들의 열매에 어느 정도 이 물질이 함유하는 가를 조사할 목적으로 본 연구에 착수하였다. 감귤껍질의 약효성분인 hesperidin의 함량을 HPLC법으로 정량하였고, 감귤과 가까운 식물이며 제주도에 생산되는 재래종인 인창귤, 사두감, 제주레몬, 유자들과의 hesperidin 함량을 비교한 결과, 인창귤의 껍질에는 2.50%, 사두감 껍질에는 3.56%가 함유되어 있었다. 이러한 결과로부터 인창귤과

사두감도 자원으로 활용할 수 있음을 확인하였다.

제 4차년도: 성숙기에 있어서 귤피류의 성분변화 조사

9월, 10월, 그리고 11월은 감귤 및 근연식물의 열매들이 성숙하는 시기이다. 이 시기에 있어서 약효성분들이 어떻게 변하는가를 HPLC로 정량하여 조사하였다. 이러한 실험은 유효성분들을 언제 채취하는 것이 가장 효율적인가를 판단할 수 있는 근거가 되었다. hesperidin 함량은 9월에는 5.4%, 10월에는 4.5%, 11월에는 3.0%이었다. 그러므로 9월에 덜 익은 감귤도 자원으로 활용할 수 있다고 판단된다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

제주도에서 생산되는 감귤은 한해 약 70-80만톤이 생산되고 있다. 알맹이는 식용으로 사용되고 있으나 껍질은 대부분 폐기물로 처리되고 있다. 그러나 hesperidin, naringin 등 약효성분은 껍질에 포함되어 있다. 그러므로 유효성분들을 추출하여 순환기 질병의 예방 및 치료제로 활용하고자 하는 것이 본 연구의 핵심이다. 감귤의 껍질에서 추출한 hesperidin, naringin 등을 포함하는 추출물은 혈액 속에 존재하는 콜레스테롤의 양을 감소시키는 실험결과가 나왔다. 그러므로 우선 건강식품 또는 기능성식품으로 개발하고, 다음에 몇가지 유효성분을 중심으로 순환기계 치료약으로 개발될 수 있을 것으로 생각된다. 이와 같은 용도로 사용하기 위하여 제일 문제가 되는 것은 귤껍질에 남아있는 농약이 문제가 될 것이므로 이의 해결책이 있어야 할 것으로 생각된다.

여 백

SUMMARY

The contents of hesperidin and naringin, the flavonone glycosides of *Citrus* plants, were determined with HPLC. The HPLC analysis was carried out using a reversed phase Nova-Pak C₁₈ column, methanol-water (27:73) as the mobile phase. Eight species of *Citrus* plants in Cheju island were compared with their content of hesperidin and naringin in the period of maturity.

Ten lignans have been isolated from the fruits of *Schizandra chinensis*. They were identified as wuweisizu C (130mg), gomisin N (2g), benzoylgomisin O (10mg), gomisin L1 (3mg), gomisin L2 (5mg), tigloylgomisin P (5mg), gomisin A (320mg), schizandrin (200mg). These have been clarified to show inhibitory activity against Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase with the IC₅₀ values of 25-100 μ M.

Twelve compounds have been isolated from the fruit of *Crataegus pinnatifida*, among them two compounds new, 11,12-dimethoxy-3,4-furano-1,2-naphthaquinone and 11,12-dimethoxy-3,4-furano-5-hydroxy-1,2-naphthaquinone. And from the leaf of *Crataegus pinnatifida*, two compounds have been isolated.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	
1. Requirement for research	203
2. Purpose of research and contents	205
1) Final purpose	205
2) Content and scope of research	205
Chapter 2. Situation of technical development in domestic and outside country	
1. Outside country	207
2. Domestic	207
Chapter 3. Contents and results in research	
1. Contents	209
2. Results	209
Chapter 4. Achievement in research purpose and contribution	
1. Achievement	243
2. Contribution	243
Chapter 5. Plan for application of research results	245
Chapter 6. References	247

여 백

목 차

제 1 장 서 론	
제 1 절 연구개발의 필요성	203
1. 경제, 사회적 측면	203
2. 기술적 측면	204
제 2 절 연구개발 목표 및 내용	205
1. 최종 목표	205
2. 연구 개발 내용 및 범위	205
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	
제 1 절 국외 연구 개발 현황	207
제 2 절 국내 연구 개발 현황	207
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	
제 1 절 순환기 치료생약과 약용식물조사와 선정, 귤피의 유효성분추출조건 확립	209
제 2 절 오미자 및 산사나무잎의 성분 분리	220
제 3 절 산사자의 성분 및 재래종 귤피류의 hesperidin과 naringin의 함량조사	230
제 4 절 성숙기에 있어서 귤피류의 성분변화 조사	236
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	
제 1 절 연구개발목표의 달성도	243
제 2 절 대외 기여도	243
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	245
제 6 장 참고 문헌	247

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 필요성

일반적으로 사용하는 순환기 치료제는 대부분이 합성의약품이므로 부작용 때문에 효과면에서 한계성을 드러내고 있다. 따라서, 민간요법으로 쓰고 있는 생약으로 부터 신규의약품을 찾으려는 노력이 활발히 진행되고 있다. 이런 목적을 달성하기 위하여는 활성성분을 분리, 구조결정, 유도체합성이 뒤 따라야한다. 뿐만 아니라, 안전성, 체내흡수, 대사 배설 등, 약동력학적 시험, 임상시험 등 각 분야의 전문가가 해당분야에 심혈을 기울여 서로 연계되어야 한다. 1987년 물질 특허 도입후 우리나라도 신물질 창출에 지속적인 노력과 투자로 그 가능성이 제품화로 연결할 수 있는 자신감이 대학, 연구소에서 나타나고 있어 신약개발시대에 접어들고 있다. 의약품시장은 정치적, 경제적 안정과 국민수입의 증가, 관련회사의 제조능력, 국민의료보험, 사망원인 등과 밀접한 관계가 있다. 최근 선진국의 약효별 생산순위는 항생물질이 가장 많고, 뒤이어 순환기약, 효소제제, 대사성의약품, 중추신경계약, 소화기관약품으로 되어있고, 국내에서도 생산순위는 항생물질이 가장 많고 순환기약, 소화기관약품, 자양강장 변질제, 중추신경계약, 대사성의약품 순이므로 거의 비슷한 추세이다. 그러나 수요변화는 질병이나 사회 변화에 따라 변할 수 있으며, 사회가 고령화함에 따라 성인병이 증가하고 있다. 특히, 항암제, 순환기용약, 이노제, 당뇨병 관련의약품이 늘어나고 있는 추세가 이를 뒷받침한다. 그러므로 민간약으로 쓰고있는 천연자원을 이용하여 신규의약품을 개발하는 일은 약효가 우수하면서 부작용은 적고 거기다 비교적 생산비가 적게 되는 이점이 있다. 이런 목적으로 중국한의서, 중약대사전 등을 포함한 문헌정보시스템을 통하여 선정된 생약 중에서 우리나라의 농가에서 재배하는 농산물로 부터 표준엑스제조법을 이용하여 추출, 분획, 분리, 정제과정을 거쳐 효능을 검색하므로써 새로운 심혈관 질병의 예방 및 치료용 활성물질을 개발, 농가소득에 이바지하고자 한다.

1. 경제, 사회적 측면

발초혈관 순환장애의 대표적인 약물인 은행잎 제제의 1994년도 국내시장은 200억 원을 넘어 섰으며, 신규생산 판매회사의 참여확대로 성인병 치료제 시장에서의 새로

운 영역을 구축할 것으로 보여 수년내에 1,000억원의 시장을 이룰 것으로 의약업계는 내다 보고 있다. 독일의 Schwabe, 프랑스의 입센보포르 등의 다국적 기업의 국내시장 침투도 이루어지고 있어 이러한 시장환경과 외국산업계의 동향으로 볼 때 말초혈관 순환장애 치료 분야에서의 신약개발은 시장창출과 시장점유에 중요성을 내포하고 있다고 할 수 있다.

사회 구성원 중 고령 인구가 증가함에 따라 말초혈관 순환장애로 인한 각종 성인병에 대한 관심이 높아지고 있다. 사회적으로 주요한 위치를 차지하고 있는 이들의 활동력을 저하시키는 동시에 많은 치료비 지출이 부수됨으로써 야기되는 사회, 경제적 손실은 막대하다. 따라서 말초혈관 순환장애에 유용하게 사용할 신약의 개발은 사회적으로 그 필요성과 의의가 지대하다. 다음의 생약재배 또는 수출입현황에서 보듯이 우리나라는 생약의 수출보다 수입량이 증가하고 있는 추세로서 외화의 막대한 지출이 있으므로 수입되는 생약들을 농민이 재배하므로써 농가의 수입증대도 꾀하고 나아가 외화획득에 도움을 줄 것으로 기대한다.

2. 기술적 측면

우리나라의 농가에서는 생약으로 쓰이는 약용식물을 많이 재배하고 있다. 생약으로 부터 신약을 개발하는 중요한 잇점으로는 (1) 새로운 작용을 갖는 신물질, (2) 새로운 골격의 신물질, (3) 독성이 적은 신약의 발굴 가능성이 높다는 점이다. 수천년간 사용되어온 생약의 주된 용도가 성인병과 관련이 깊은 질환에 응용되어 왔으며, 최근의 국내의 생리활성 천연물화학의 비약적인 발전으로 볼 때, 의약선진국과 우리의 기술격차는 크지 않으며 국내의 관련자원을 효율적으로 이용하면 선진기술과 대등하게 혈관 예방 및 치료약을 개발할 수 있다고 생각한다.

본연구실은 수년간에 걸쳐 생약으로 부터 생리활성물질에 관한 연구기반이 조성되어 있다. 약용식물 자원연구 및 국책과제로서 식물자원으로 부터 순환기계, 항암, 및 치주질환에 대한 활성물질의 분리 연구과정 중 수십종의 물질들을 분리하였고, 이미 확보된 20종의 순환기계 치료용 생약들의 표준엑스 분획 시료를 수집해 놓고 있다. 연구개발하려는 기술 또는 연구개발내용의 세계적 수준이 다음의 기술발전 주기 중 개념정립단계, 생산활용단계, 기술의 안정화 단계를 거치고 하는 것은 약효가 우수하면서 비교적 저가의 신약을 개발할 수 있기 때문이다.

천연물로 부터 질병내용과 관련되어 분리한 성분 또는 생약추출물들이 신약으로 개발가능한 30가지는 우수한 분야별 공동연구가 안되고 업계의 호응이 미흡하여 신약화되지 못하고있다. 수천년간 전해내려온 동약의 전통약물은 경험에 비추어 서양보

다는 분명히 신약개발에 있어 우위에 있음에도 관련 연계기술의 미흡하여 활용되지 못하고 있다. 생약을 이용한 신약개발이 세계적 추세이지만, 선진국이 찾아내지 못한 세계 최초의 신물질들이 약효실험을 거쳐 의약품이 되면 높은 부가가치를 부여할 수 있다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 최종 목표

- 1) 폐기되는 농산물의 부산물을 이용함으로써 농가소득의 증대
- 2) 혈관내 atheroma plaque 생성억제 및 용출작용을 지표로 하는 신규의약품 개발
- 3) 국제특허 획득에 의한 약효물질군의 수출

2. 연구 개발 내용 및 범위

문헌을 통하여 전통적으로 사용되어 온 생약들을 조사하는 일이 신제품 개발을 시간적으로나 경제적으로 신제품 개발을 앞당기는 일이 될 것이다. 왜냐하면 “동의보감”이나 “동의수세보원”에 수재된 생약이나 처방을 신제품화할 경우에는 임상실험이 면제되기 때문이다. 이러한 생약이나 처방이 제제화될 경우에는 원료의 확보를 위한 약용식물의 국내재배가 뒤따르게되므로 농가의 수입이 늘어나는 계기가 될 것이다. 그리고 표 1, 2, 3에서 보듯이 수입 또는 수출이 잘되는 약용식물을 면밀하게 분석하여 농민들의 재배작목으로 선정하는 일이 중요하다.

본 연구의 가장 관심을 가지고 실험한 감귤은 제주도의 농가에서 대량으로 생산되며 생약자원으로도 이용하고 농산품의 부산물인 귤껍질은 폐기되므로 이것을 실험재료로 하였다. 진피(陳皮)는 한방에서 소화기계 질환에 이용된다.¹⁾ 귤나무 열매에는 다종의 flavonoid 배당체를 함유하며 hesperidin이 주성분이며 쓰고 단맛을 내는 것으로도 알려져 있다.²⁾ 또한 hesperidin은 모세혈관 강화작용이 있어서 고혈압치료와 방사선으로 인한 부상에도 적용할 수 있으며,³⁾ 인플루엔자에 대한 항바이러스 효과와 항산화작용이 보고되었고,⁴⁻⁵⁾ 화학물질에 의하여 유도되는 방광암, 대장암, 구강암 및 식도암 등에 대하여서도 억제효과가 있다고 알려져 있다.⁷⁻¹⁰⁾ naringin 또한 Citrus속에 함유된 쓴맛을 나타내는 플라보노이드 성분으로서¹¹⁾ 안 등은 naringin 및 가수분해물이 항균작용이 있다고 하였으며,¹²⁾ benzo[a]pyrene에 대한 항변이활성을

나타낸다는 보고도 있다.¹³⁾ protein phosphatase 억제제인 okadaic acid의 억제제로 알려지면서 많은 연구가 진행되었는데 Gordon 등의 연구에 의하면 쥐의 간세포에서 protein phosphatase 억제제인 okadaic acid가 세포를 lysosome으로 이동시켜 분해시키는 autophagy를 억제시키는 데 naringin에 의하여 그 작용이 억제되므로 간세포를 보호한다고 하였다.¹⁴⁾ okadaic acid에 의하여 phenobarbital로 유도되는 Cyp2b10 gene의 발현 억제를 naringin으로 보호할 수 있다는 보고도 있다.¹⁵⁾ 그리고 감귤은 심장의 혈관에 대한 작용으로 소량에서는 심장의 수축력을 증강시키고 혈액의 수량을 증가시키지만 심박수에 대한 영향은 없으며 대량투여시엔 심장의 억제작용이 나타난다. CP에 대한 성분연구로는 플라보노이드계 성분, Coumarins계 성분, 및 Homoacridone alkaloids 등이 보고되어 있다. 생리활성에 대한 연구로는 교감신경에 작용하는 물질, 항 알러지작용, 및 항 산화작용 및 근이완작용등의 생리활성에 대하여 보고되어 있다.

Citrus속 식물에 대한 성분분류학적인 연구로는 Kefford가 hesperidin 군 및 naringin 군으로 나눈 보고¹⁶⁾를 시초로 여러 학자들에 의하여 연구되었는데, hesperidin, neohesperidin, naringin 및 isonaringin 등의 플라보노이드계 성분으로 분류하였다. 이러한 연구들을 바탕으로 감귤 및 근연식물의 껍질에 함유된 hesperidin 및 naringin의 함량, 유무, 그리고 성숙기에 있어서 변화 등을 연구함으로써 순환기치료제 개발에 관한 기초연구를 하였다 (Table 1).

Table 1. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
제1차년도 (1995-1996)	자원확보 및 순환기 약물 개발 가능성 타진	순환기 농산물(생약) 조사와 선정 감귤 유효성분 추출조건 확정
제2차년도 (1996-1997)	신규 순환기 의약품 창출을 위한 성분조사	오미자, 산사나무 잎의 성분연구
제2차년도 (1997-1998)	자원확보 및 수입대체 가능성 타진	산사나무열매(산사자) 성분연구 감귤 및 근연식물 열매의 hesperidin 함량조사
제4차년도 (1998-1999)	산업화에 대비한 원료확보, 채취시기 결정	성숙기에 있어서 감귤의 유효성분 함량변화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 연구개발 동향

합성의약품은 수종이 개발되어 있으나 생약으로 부터 약효실험을 거쳐 시판되고 있는 것은 그 예가 적다. 대표적인 것으로 독일에서 개발한 은행잎이 말초혈관 장애 개선제로 제제화되어 시판되고 있으며 서양산사나무(*Crataegus oxycantha* L. em Jacq.)의 잎 추출물이 역시 제제화되어 시판되고 있다. 중국에서는 해풍등이란 생약으로 부터 항류마티스 및 알러지, 혈액개선 치료제로 kadsurenone 등이 있다. 혈중 콜레스테롤 저하제로는 HMG-CoA의 저해제인 Lovastatin이라는 제품이 생산되어 전세계에 공급되고 있으며 국내에서도 연간 판매량이 400억에 이르고 있다. 본 의약품의 성분은 세균 대사산물에서 유래한 것으로 천연물에서 항콜레스테롤 제제의 출현은 계속되리라 판단된다.

제 2 절 국내 연구개발 동향

대표적인 것으로 독일에서 개발한 은행잎이 말초혈관 장애 개선제로 제제화되어 시판되고 있으며 서양산사나무(*Crataegus oxycantha* L. em Jacq.)의 잎 추출물이 역시 제제화되어 시판되고 있다. 서울대 천연물연구소의 한용남교수는 측백나무(*Biota orientalis* L.) 잎에서 BO-V-2라는 물질을 분리하여 PAF receptor에 대한 실험 결과 은행잎의 약효성분군인 ginkgolides에 필적하는 약효를 발현한다고 보고하므로써 새로운 순환기 치료제의 출현이 기대된다.

문제점 및 전망

새로운 의약품을 개발하는 데는 보통 7-10년간의 시간이 걸리며 개발비용도 500억-1,000억이 소요된다. 그러므로 우리나라와 같이 제약기업의 경제구조가 열악한 상태에서는 전통적으로 사용해온 생약으로부터 새로운 의약품을 개발하는 것이 시간적으로나 경제적으로 유리하다. 천연물로부터 독일에서 개발한 은행잎이 말초혈관 장애 개선제로 제제화되어 시판되고 있는 데 그 원료는 우리나라의 은행잎에 유효성분의

함량이 많아 수출되고 있다. 서양산사나무 (*Crataegus oxycantha* L. em Jacq.)의 추출물 역시 제제화되어 국내에서 시판되고 있으나 원료를 수입하고 있는 실정이다. 국내에서도 산사나무 (*Crataegus pinnatifida* Bunge), 넓은잎산사 (*C. pinnatifida* var. *major* N.E.Br.), 좁은잎산사(*C. pinnatifida* var. *psilosa* Schneid.), 털산사 (*C. pinnatifida* var. *pubescens* Nakai) 등이 자생하고 있다. 그러므로 이들에 함유되어 있는 약효성분을 정량하여 서양산사자 보다 함량이 높다고 판정되면 수입대체로 인한 외화절감은 물론 수출도 가능할 것으로 전망된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구는 “심혈관질환의 예방, 치료용 활성물질을 함유한 농산물의 탐색 및 개발에 관한 연구”로서 “농산자원으로부터 심혈관질환 예방, 치료활성 신소재 개발에 관한 연구”의 위탁과제이다. 본 연구는 4년차로 나누어 이루어졌으며 목적하는 바를 달성하기 위하여 연구개발목표를 설정하고 목표에 맞도록 연구내용 및 범위를 정하였다.

제 1 절 순환기 치료생약과 약용식물 조사 및 선정, 감귤의 유효성분 추출조건 확립 (제 1차년도)

순환기 치료 생약 또는 약용식물을 조사 선정하여, 순환기 질병 치료 효능을 검증함으로써 부가 가치도 높이고 농민들의 소득 증대에 이바지하기 위하여 전통적으로 사용되어 온 순환기계 생약들을 동의보감이나 생약교과서 등에서 발췌하였다. 그리고 이들 생약자원 가운데서 가장 개발 가능성이 높은 것은 감귤이라고 생각하였다. 감귤의 껍질에 함유된 hesperidin을 효율적으로 추출할 수 있는 방법을 모색함으로써 경제적으로 유익한 방법을 확립하였다.

1. 순환기 치료생약 또는 약용식물들

1) 감귤나무 *Citrus unshiu* Markovich (운향과)

본식물의 열매의 껍질을 한방에서는 陳皮(Citri Leiocarpae Exocarpium)라 하여 주로 방향성 건위제로 사용하고 있다. 陳皮에는 hesperidin, naringin 등을 위시하여 많은 플라보노이드 성분들이 함유되어 있어서 혈압강하 및 순환기계 질병 치료제로 동서양을 막론하고 사용하고 있다. 이런 점에 착안하여 새로운 순환기 질병의 예방 및 치료제로 개발 할 수 있는 자원이다.

2) 산사나무 *Crataegus pinnatifida* var. *typica* Schneider (장미과)

본식물의 열매를 한방에서는 山査子(Crataegi Fructus)라 하며 약용으로 하고 있다. 잎과 열매의 에타놀엑스는 혈액순환개선제로 개발되어 노인 및 급성전염병에 의

한 심근쇠약 환자들을 위한 심장강화제로 시판되고 있다. 판막장애, 협심증, 심장신경증, 심계항진, 소화불량에도 사용된다. 전국의 산에서 자라며 집 근처에서 재식하고 있으므로 서양산사자(*Crataegus oxycantha* L. em Jacq.)의 추출물 역시 제제화되어 국내에서 시판되고 있으나 원료를 전량 수입하고 있는 실정이다. 국내에서도 산사나무(*Crataegus pinnatifida* Bunge), 넓은잎산사(*C. pinnatifida* var. *major* N.E.Br.), 좁은잎산사(*C. pinnatifida* var. *psilosa* Schneid.), 털산사(*C. pinnatifida* var. *pubescens* Nakai) 등이 자생하고 있으므로 수입대체의 가능성이 높으며 농가 부업으로 적당한 수종이다.

3) 오미자나무 *Schizandra chinensis* (Turcz.) Baillon (목련과)

본식물의 열매를 한방에서는五味子(*Schizandrae Fructus*)라 하며 진해거담제로 사용하고 있다. 그리고 오미자는 민간에서 어혈 등 순환기치료제로도 이용하고 있음에 착안하여 본 실험에 사용하였다.

4) 두충나무 *Eucommia ulmoides* Oliver (두충나무과, Eucommiaceae)

본식물은 줄기의 껍질을 杜冲(*Eucommiae Cortex*)이라 하며 예로부터 자양강장 또는 혈액순환개선제로 한방 또는 민간에서 사용해 왔다. 중국원산이나 국내에서도 재식을 많이 하고 있으며 신규혈행개선제로의 개발 가능성이 높으며 건강식품으로도 그 시장성이 높다고 하겠다.

5) 뽕나무 *Morus alba* L. 산뽕나무 *Morus bombycis* Koid. (뽕나무과, Moraceae)

뽕나무나 산뽕나무의 뿌리껍질을 상백피(*Mori Cortex Radicis*)라 하여 혈압강하 및 혈당강하약으로 사용해오고 있다. 최근의 연구로는 이 생약에 함유된 프라보노이드 성분들이 이러한 약효를 입증하고 있으며 이식물의 잎을 먹고 자란 누에의 대변에서 혈압강하작용이 입증되어 제제화되어 있다. 그러므로 우리나라 전지역에서 자생 또는 재식하고 있는 본식물의 농업자원으로 활용할 수 있을 것이다.

6) 여로 *Veratrum viride* Aiton (백합과, Liliaceae)

본 식물의 뿌리를 여로근(*Veratri Rhizoma*)이라 하며 예로부터 심장병 치료제로 널리 사용해오고 있다. 북아메리카의 인디언들도 본생약을 고혈압 환자 치료에 응용하였으며 1862년 유럽에 전파되었다. 유럽에서는 오래 전 부터 흰여로(*V. album* L.)은 1950년대 까지 사용하였다. 그 후 광범위한 연구에 의하여 고혈압환자의 치료에

사용되어 왔다. 본 식물들은 우리나라의 어느산에서나 분포되어 있으며 의약품으로 개발되어 치료약으로 사용될 수 있으며, 재배가 손쉬워 농가 소득원이 될 수 있을 것으로 판단된다.

7) 삼지구엽초 *Epimedium koreanum* Nakai (매자나무과, Berberidaceae)

본 식물의 지상부를 음양곽(Epimedi Herba)이라 하며 옛날 부터 강정약, 강심, 이뇨, 신경성 강장제로 사용해오고 있다. 최근의 연구에 의하면 하복부 요점부의 혈관을 선택적으로 확장시켜 성기에 자극을 주므로 성욕증진제로 사용되고 있다. 우리나라에 흔하지는 않으나, 재배에 큰 어려움이 없다.

8) 회화나무 *Sophora japonica* L. (콩과, Leguminosae)

본 식물의 꽃봉오리를 괴화(Sophorae Flos)라 하며 뇌일혈예방, 지혈 등의 목적으로 사용해오고 있다. 최근의 약리실험에서 혈관의 저항성 증가와 혈관 투과성의 저하 등의 약효가 보고되어 있다. 우리나라 전지역에서 자생하거나 재식하고 있으므로 신규의약품 개발이 기대된다.

9) 오이풀 *Sanguisorba officinalis* L. (콩과, Leguminosae)

본 식물의 뿌리를 지유(Sanguisorbae Radix)라 하며 예로부터 지혈, 해독, 월경과다, 혈리, 외상출혈 등에 사용해 오고 있다. 최근의 연구에 의하면 혈액 응고계에 대한 억제작용, 플라스민 활성화저해작용 등의 약효가 보고되어 있다. 우리나라의 산이나 들에 흔히 자라는 식물로서 자원이 풍부하다.

10) 천마 *Gastrodia elata* Blume (난과, Orchidaceae)

우리나라의 산에서 자라고 일부 재배하는 천마 *Gastrodiae Rhizoma*의 뿌리줄기, 사지경련, 현훈, 발작 등에 사용하고 있다. 예로부터 증풍치료에 많이 응용되어온 점에 주목할 필요가 있다. 생약 중 고가생약에 속하므로 농민의 농가 소득에 권장할 만하다.

11) 오이풀 *Sanguisorba officinalis* L. (콩과, Leguminosae)

본 식물의 뿌리를 지유(Sanguisorbae Radix)라 하며 예로부터 지혈, 해독, 월경과다, 혈리, 외상출혈 등에 사용해 오고 있다. 최근의 연구에 의하면 혈액 응고계에 대한 억제작용, 플라스민 활성화저해작용 등의 약효가 보고되어 있다. 우리나라의

산이나 들에 흔히 자라는 식물로서 자원이 풍부하다.

12) 소리쟁이 *Rumex japonicus* Houttyn (파디풀과, Polygonaceae)

본 식물의 뿌리를 양채근(Rumecis Radix)라 하며 예로부터 지혈, 토혈, 자궁출혈, 변혈, 변비에 사용하여 왔다. 우리나라 전지역에 흔하게 자라는 식물이다.

13) 천마 *Gastrodia elata* Blume (난과, Orchidaceae)

우리나라의 산에서 자라고 일부 재배하는 천마 *Gastrodiae Rhizoma*의 뿌리줄기, 사지경련, 현훈, 발작 등에 사용하고 있다. 예로부터 중풍치료에 많이 응용되어온 점에 주목할 필요가 있다. 생약 중 고가생약에 속하므로 농민의 농가 소득에 권장할 만하다.

14) *Achyranthes japonica* Lev. et Van. (비름과, Amaranthaceae)

본 식물의 뿌리를 우슬(*Achyranthis Radix*)이라 하며 예로부터 항혈전제로 사용하여 왔다. 우리나라 전역에 걸쳐 흔하게 자라는 식물의 하나이다.

15) 작약 *Paeonia albiflora* var. *tricarpa* Bunge (미나리아재비과, Ranunculaceae)

본식물의 뿌리를 작약(*Paeoniae Radix*)이라 하며 예로부터 활혈, 구어의 목적으로 사용해 오고 있다. 최근의 연구로는 혈압강하작용, 혈소판응집저지작용 등이 보고되어 있다. 우리나라 농가에서 많이 재배하고 있는 약용식물의 하나이다.

16) 당귀 *Angelica gigas* Nakai (미나리과, Umbelliferae)

본 식물의 뿌리를 당귀(*Angelicae Gigantis Radix*)라 하며 예로부터 빈혈, 활혈 효과가 있어 혈행장애에 의한 부인과 질환에 사용되어 오고 있다. 최근의 연구보고에 의하면 토끼의 적출장관 및 심자에 대하여 그 운동을 마비시키고 혈압강하 및 호흡억제작용이 있다고 한다. 우리나라 어느곳에서나 재배가 가능하다.

17) 천궁 *Cnidium officinale* Makino Umbelliferae

본 식물의 뿌리줄기를 천궁(*Cnidii Rhizoma*)이라 하며 예로부터 진정, 진경, 빈혈, 두통, 보혈강장에 사용해오고 있으며 여성의 냉증, 성주기장해 등 부인과 제질환에 사용해오고 있다. 최근의 연구에 의하면 개구리 혈관관류실험에서 혈관확장작용을

보였고 토끼의 경동맥 혈류에 대하여 저농도에서 항진, 고농도에서는 억제작용을 나타낸다고 한다. 울릉도를 비롯하여 전국에서 널리 재배하고 있으므로 신의약품으로 개발되면 농가소득 향상에 도움이 클 것이다.

2. 굴피의 추출조건

가. 실험재료 조제

유성시장에서 구입한 굴의 껍질을 건조한 다음 분쇄하여 약 5 그램씩 취한다 (각 군에 3개씩).

→ 각 군에 200ml씩의 추출용매를 넣고 각 조건에서 환류 추출.

→ 온시에 감압 여과하여 농축하고 진공건조기에서 건조

→ 각각의 엑스에 MeOH 100ml를 가하여 5분간 초음파로 진탕추출하고 불용물을 여과한 액을 검액으로 한다.

→ HPLC analysis.

나. 장치

: 적외선 수분측정기

Kett 620(Moisture determination balance FD-620)

Transsonic 890/H (Elma)

HPLC system

Pump: Hitachi L-6000 pump

Detector: Hitachi L-7400 UV detector

Column oven: Hitachi L-7300 (Temp. 35℃)

Autosampler: Hitachi L-7200

Integrator: Hitachi D-2500 chromato-integrator

다. HPLC 조건

Column: μ -Bondapak C18, 3.9×300mm.

Detector: 자외부흡광도계(측정파장 280nm)

Mobile phase: 40% MeOH

Flow rate: 1.0ml/min

Injection volume: 10 μ l (Autosampler 이용)

STD: hesperidin(Nacalai Tesque Inc. KYOTO, Japan)=0.53mg/ml

라. 표준품 hesperidin의 분리

귤껍질 1kg을 MeOH 3 l 로 환류시키면서 24시간씩 3회 추출하여 여과한 후, 추출액을 감압, 농축하여 메탄올엑스를 얻었다. 이것을 물에 현탁시키면 침전물이 생기는데 이것을 여과하여 제거한다. 여액에 aluminium acetate를 가하여 생기는 침전물을 여과하여 제거한다. 여을 농축하고 여기에 에틸아세테이트를 가쳐 추출, 에틸아세테이트층을 에틸로 포화시켜 냉장고 방치하면 hesperidin을 함유한 플라보노이드 성분들이 석출한다. 이것을 column chromatography하여 hesperidin (Fig. 1)을 얻고 메탄올에 재결정하여 표준품으로 하였다.

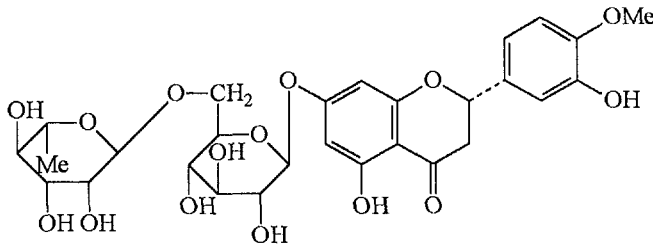


Fig. 1. The structure of hesperidin.

마. 추출조건에 의한 hesperidin의 함량

(1) 검액의 제조

각각의 시료를 가루로 한후 그중 2.5g씩을 정밀히 취해 메탄올 50ml를 가하여 수욕상에서 6시간동안 환류추출 하였다. 실온에서 식힌다음여과하고 메탄올을 가해 50ml로 하였다. 이 액을 다시 5배 희석하고 여과한후 검액하였다. 이 과정을 3회 반복하였다.

(2) 표준액의 제조

Hesperidin 표준품을 1mg/ml 용액으로 만들고 이 액을 각각 50, 100, 200,

300, 400 μ l씩 취한 후 감압농축하였다. 여기에 메탄올 1ml를 가해 녹여 각 표준액의 농도가 50, 100, 200, 300, 400 μ g/ml가 되도록 조제하여 검량선을 작성하였다.

(3) HPLC 분석조건

Column : INERTSIL 5 C8 P#0297-150*046 S#9510515

Column 온도 : 40 $^{\circ}$ C

검출기 : 자외부흡광도계 (측정파장 280nm)

이동상 : 메탄올 : 물 = 37 : 63

유속 : 1.0ml/min

주입량 : 5.0 μ l

(4) 결과

(가) 검량선

각 표준용액 5 μ l씩을 취해 위의 조건으로 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram 으로부터 peak 면적과 표준용액 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다. 그 결과 $y = 7369.541x + 217261.8$ ($r = 0.9931$)의 직선을 나타내었다 (Fig. 2).

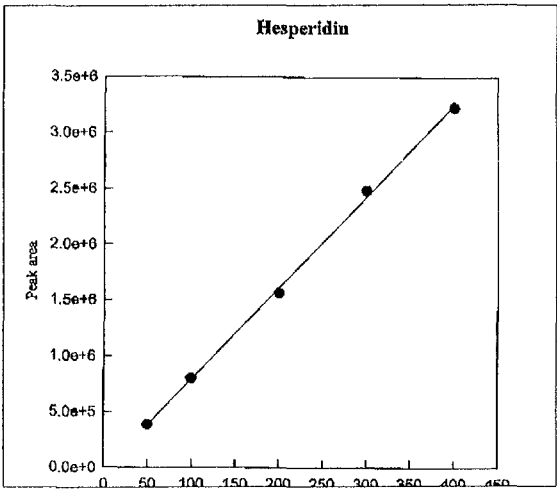


Fig. 2. Calibration curve of hesperidin by HPLC.

(나) 함량평가

검액 5 μ l씩을 정확히 취하여 위의 조건에서 실험하였다. 각 검액에서 얻은 hesperidin의 peak 면적을 검량선에 대입하여 hesperidin의 양을 구하고 각 시료들의 hesperidin 함량을 구했다 (Table. 2).

3. 결과 및 고찰

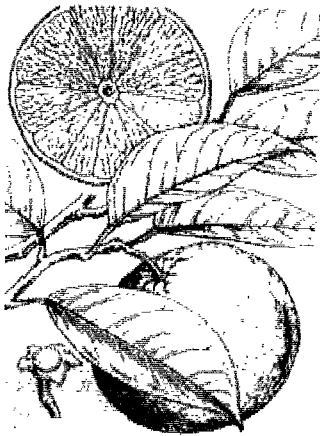
가. 순환기 치료생약 및 약용식물

동의보감, 현대생약학, 및 참고문헌에서 조사한 순환기 치료생약을 조사한 결과 귤피(橘皮), 오미자(五味子) 및 산사나무의 잎을 실험재료로 선정하였다.

1) 귤나무는 제주도에서 1년에 70만통 이상씩 생산되고 있으며, 알맹이는 식용으로 이용하지만 껍질은 대부분 버리므로 이것을 자원화하면 농가소득을 증대할 수 있을 것으로 판단된다.

2) 서양산사나무의 잎과 꽃을 이미 서양에서 혈액순환개선제로 사용해오고 있다. 그러므로 우리나라에 많이 자라는 산사나무의 잎을 성분분석하고 약효를 평가하므로써 새로운 순환기 치료약으로 개발 가능성이 높기 때문이다.

3) 오미자는 오래전부터 순환기 치료제로 민간에서 사용하여 왔다. 우리나라 산에서 많이 자생하고 있고 농가에서 재식할 수 있는 식물이기 때문이다.



귤나무



오미자나무



산사나무

나. 추출조건

굴피에서 분리한 hesperidin의 HPLC에서 retention time 8.59부근에서 단일 peak으로 나타났다 (Fig. 3). 그리고 굴피를 용매(MeOH, EtOH, 30% EtOH, 50% EtOH)로 추출하여 HPLC한 결과 다른 성분과 확연하게 구분될 수 있었으므로 정량에 사용할 수 있었다 (Fig. 4).

이러한 HPLC 조건에서 hesperidin을 효율있게 추출할 수 있기 위하여 추출조건을 달리한 상태에서 추출, 정량한 결과는 Table 2와 같다. MeOH에서 추출하는 것이 hesperidin의 함량이 2.81%로 가장 높았고, EtOH로 추출한 것은 hesperidin의 함량이 0.72% 정도이었으며 30% 또는 50% EtOH로 추출하였을 때도 이것과 비슷하였다. MeOH로 추출하는 것이 추출효율은 좋았으나 MeOH 자체의 독성 때문에 EtOH로 추출하는 것이 바람직하다고 생각한다.

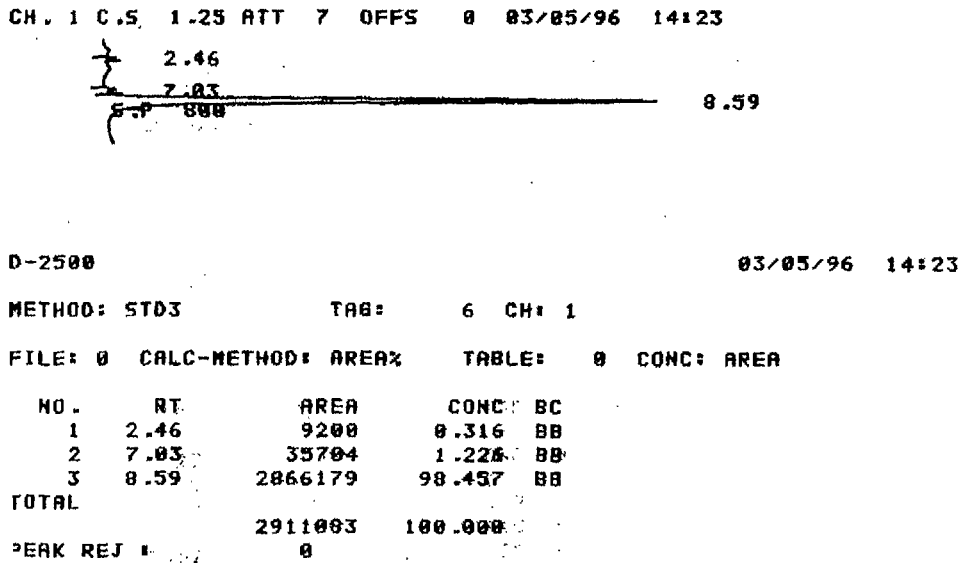
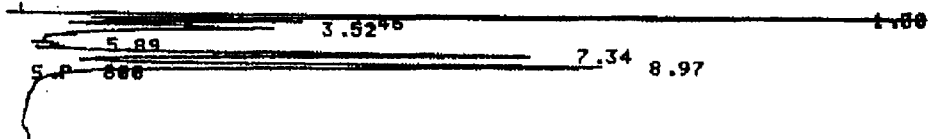


Fig. 1. HPLC profile of hesperidin.

CH. 1 C.5 1.25 ATT 7 OFFS 0 03/05/96 15:09



D-2500

03/05/96 15:09

METHOD: SAM3-2 TAG: 8 CH: 1

FILE: 0 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	1.70	1795834	16.196	BV
2	1.88	1388086	12.519	UV
3	2.46	537330	4.846	UV
4	3.52	1367001	12.329	UB
5	5.89	29318	0.264	BB
6	7.34	2485711	22.418	BV
7	8.97	3484844	31.429	UB
TOTAL		11088124	100.000	

Fig. 2. HPLC profile of peel of Citrus unshiu.

다. Calculation

1) Sample concentration.

① 수분함량을 계산할 경우.

$$\text{SAM 농도}(\text{mg/ml}) = \text{SAM 무게}(\text{mg}) \times 0.8723 \times \frac{1}{100}$$

② 수분함량을 무시할 경우.

$$\text{SAM 농도}(\text{mg/ml}) = \text{SAM 무게}(\text{mg}) \times \frac{1}{100}$$

2) Hesperidin concentration

$$\text{hesperidin}(\%) = \frac{\text{STD 농도}(\text{mg/ml})}{\text{SAM 농도}(\text{mg/ml})} \times \frac{\text{SAM P. A}}{\text{STD P. A}} \times 100$$

4. 결론

가. 순환기 치료생약 및 약용식물

동의보감, 현대생약학, 및 참고문헌에서 조사한 순환기 치료생약을 조사를 통하여 귤피(橘皮), 오미자(五味子) 및 산사나무의 잎을 실험재료로 선정하였다.

나. 추출조건

MeOH에서 추출하는 것이 hesperidin의 함량이 2.81%로 가장 높았고, EtOH로 추출한 것은 hesperidin의 함량이 0.72% 정도이었으며 30% 또는 50% EtOH로 추출하였을 때도 이것과 비슷하였다. MeOH로 추출하는 것이 추출효율은 좋았으나 MeOH 자체의 독성 때문에 EtOH로 추출하는 것이 바람직하다고 생각한다.

Table 3. 각종 용매를 이용한 귤피 추출에 대한 Hesperidin 함량

추출용매		시료량 (g)	엑스량 (g)	엑 스(%)		Hesperidin의 양(%)		
				수분무시	수분계산	원 료 중		엑스중
						수분무시	수분계산	
MeOH (Soxlet, 70°C, 7시간)	1-1	5.224	5.29	49.58	53.68	2.28	2.47	4.59
	1-2	6.495	3.34	51.42	55.68	1.92	2.08	3.73
	1-3	5.270	2.73	51.80	56.10	4.22	4.56	8.14
	평균	5.663	3.78	50.93	55.15	2.81	3.04	5.49
EtOH (Soxlet, 80°C, 7시간)	1-4	5.816	2.59	44.53	48.23	0.83	0.90	1.87
	1-5	5.088	1.88	36.95	40.02	0.43	0.47	1.17
	1-6	5.114	2.42	47.32	51.25	0.89	0.96	1.87
	평균	5.339	2.30	42.93	46.50	0.72	0.78	1.64
H ₂ O (수욕, 80°C, 4시간)	2-1	5.1691	2.74	53.01	60.77	0.80	0.91	1.50
	2-2	5.1202	2.57	50.19	57.54	0.895	1.03	1.78
	2-3	5.1263	2.72	53.06	60.83	0.645	0.74	1.22
	평균	5.1385	2.68	52.09	59.71	0.78	0.89	1.50
30% EtOH (수욕, 80°C, 4시간)	2-4	5.2234	3.11	59.54	68.26	0.57	0.65	0.96
	2-5	5.0905	2.75	54.02	61.93	1.07	1.23	1.98
	2-6	5.2136	2.57	49.29	56.51	1.26	1.44	2.55
	평균	5.1758	2.81	54.28	62.23	0.97	1.17	1.83
50% EtOH (수욕, 80°C, 4시간)	2-7	5.2619	3.83	72.79	83.44	1.01	1.16	1.39
	2-8	5.1472	3.40	66.06	75.73	0.71	0.81	1.07
	2-9	5.1641	3.52	68.16	78.14	0.93	1.07	1.37
	평균	5.1911	3.58	69.00	79.10	0.88	1.01	1.28
30% EtOH (수욕, 60°C, 4시간)	3-1	5.215	2.01	38.54	44.18	1.11	1.27	2.88
	3-2	5.089	2.17	42.64	48.88	1.26	1.45	2.96
	3-3	5.103	1.93	37.82	43.36	1.13	1.30	2.99
	평균	5.136	2.04	39.67	45.47	1.17	1.34	2.94

제 2 절 오미자 및 산사나무잎의 성분 (제 2차년도)

두 가지의 연구를 수행하였다. 하나는 순환기치료제의 개발 가능성이 높은 오미자의 성분을 연구하였고, 다른 하나는 산사나무 잎의 성분을 연구하였다.

1. 오미자의 성분 연구

오미자 2.5kg을 95% 메탄올로 3회 추출, 감압농축하여 메탄올엑스(700g)를 얻었다. 이 것을 물에 현탁하여 hexane으로 용매 분획하여 농축, hexane 엑스(47.8g)를 얻었다. hexane 엑스를 silica gel column chromatography하여 Fr. 1에서 7까지를 얻고, 각 Fr.을 다시 column chromatography하여 8개의 lignan 물질들, wuweisizu C (130mg), gomisin N (2g), benzoylgomisin O (10mg), gomisin L1 (3mg), gomisin L2 (5mg), tigloylgomisin P (5mg), gomisin A (320mg), schizandrin (200mg)을 분리하였다.

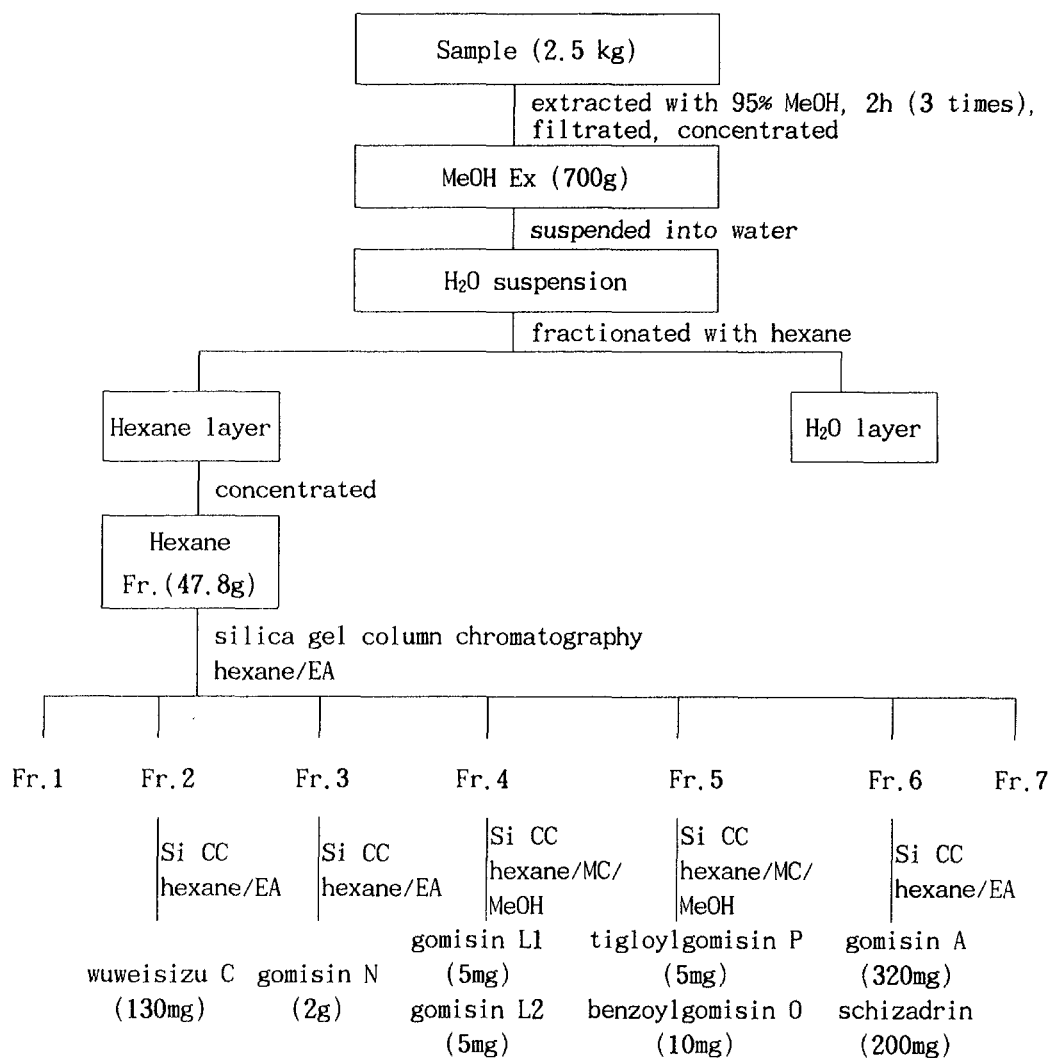
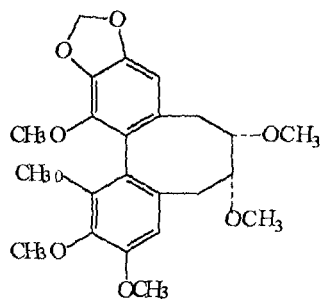
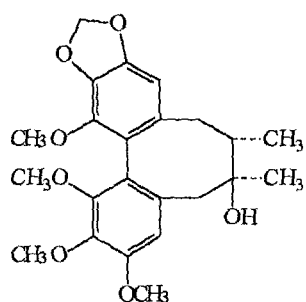


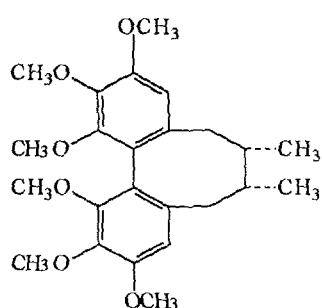
Fig. 5. Isolation of constituents from the fruits of *Schizandra chinensis* Schidrandaceae (Si CC: silica gel column chromatography; EA: ethyl acetate; MC methylene chloride).



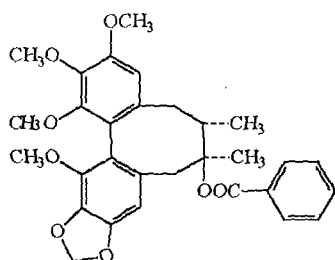
Gomisin N



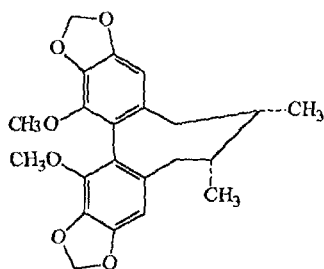
Gomisin A



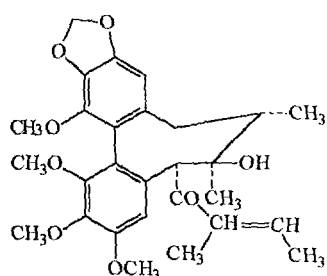
Schizandrin



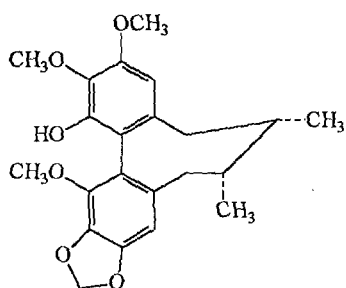
Benzoylisogomisin O



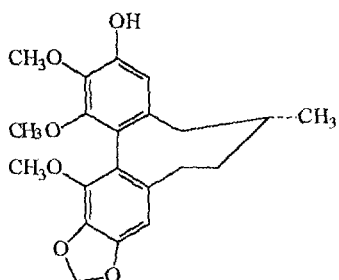
Wuweisizu C



Tigloylgomisin P



Gomisin L1



Gomisin L2

Fig. 6. Structures of constituents from the fruits of *Schizandra chinensis* Schidrandaceae.

Wuweizisu C: colorless prisms, mp 121-123°C

IR (ν $\frac{KBr}{max}$ cm⁻¹): 1610(aromatic), 949, 939(OCH₂O).

¹H-NMR(δ in CDCl₃). 0.73(3H, d, J=7Hz: H-18), 0.95(3H, d, J=7Hz: H-17), 1.83(2H, m, H-7 and H-8), 2.07(center, 2H m, H-9), 2.50(center, 2H m, H-6), 3.83(6H, s, 2×OCH₃), 5.93(4H, s, 2×-OCH₂O-), 6.48(2H, s, H-4 and H-11).

Gomisin N: colorless prisms, mp 105-107°C

IR (ν $\frac{KBr}{max}$ cm⁻¹): 1615, 1595, 1570(aromatic).

Gomisin L1: colorless prisms, mp 126.5-128°C

IR (ν $\frac{KBr}{max}$ cm⁻¹): 3405(OH), 1600, 1571(aromatic).

Gomisin L2: white amorphous powder:

IR (ν $\frac{KBr}{max}$ cm⁻¹): 3425(OH), 1611, 1582(aromatic).

MS m/z(%): 386(M⁺, 100), 300(4.2), 219(5.2).

Tigloylgomisin P: white amorphous powder:

IR (ν $\frac{KBr}{max}$ cm⁻¹): 3480(OH), 1712(ester), 1645(c=c), 1611, 1595(aromatic).

MS m/z(%): 514(M⁺, 12), 414[M⁺-CH₃CH=C(CH₃)COOH, 19], 343(43), 83[CH₃CH=C(CH₃)CO⁺, 100], 55(CH₃CH=C⁺-CH₃, 90).

¹H-NMR(δ in CDCl₃). 1.10(3H, d, J=7Hz: CH₃-8), 1.98(1H, m, H-8), 1.13(3H, s, CH₃-7), 2.07(1H, s, HO-7), 2.10(center, 1H dd, H-9 α), 2.10(center, 2H m, H-9 β), 3.53(3H, s, -OCH₃), 3.70(3H, s, -OCH₃), 3.83(3H, s, -OCH₃), 3.92(3H, s, -OCH₃), 5.37(2H, s, -OCH₂O), 5.90(1H, s, H-6), 6.13(1H, s, H-11), 6.95(1H, s, H-4).

Gomisin A: colorless needles, mp 93-94°C

¹H-NMR(δ in CDCl₃). 0.82(3H, d, J=7Hz: CH₃-8), 1.86(1H, m, H-8), 1.25(3H, s,

CH₃-7), 1.93(1H, s, HO-7), 2.34(1H dd, J=14, 7Hz, H-9 α), 2.60(1H dd, J=14, 2Hz, H-9 β), 3.52(6H, s, 2 \times -OCH₃), 3.84(6H, s, 2 \times -OCH₃), 3.91(6H, s, 2 \times -OCH₃), 5.96(2H, s, -OCH₂O), 2.35(1H, d, J=13.5Hz; H-6 β), 2.69(1H, d, J=13.5Hz; H-6 α), 6.48(1H, s, H-11), 6.63(1H, s, H-4).

Schizandrin: colorless needles, mp 128-129°C

IR (ν $\frac{KBr}{max}$ cm⁻¹): 3450, 1590.

¹H-NMR (δ in C₆D₆). 0.72(3H, d, J=7.2Hz; CH₃-6), 1.24(3H, s, CH₃-7), 1.75(1H, s, HO-7), 1.82-1.93(1H, m, H-6), 2.22(1H dd, J=14.2, 7.8Hz, H-5 β), 2.80(1H dd, J=14.2, 1.8Hz, H-5 α), 2.32(1H d, J=13.1Hz, H-8 α), 2.76(1H d, J=13.1Hz, H-8 β), 3.40(3H, s, C₆H₅OCH₃), 3.46(3H, s, C₆H₅OCH₃), 3.64(3H, s, C₆H₅OCH₃), 3.70(3H, s, C₆H₅OCH₃), 3.85(3H, s, C₆H₅OCH₃), 3.87(3H, s, C₆H₅OCH₃), 6.37(1H, s, H-4), 6.59(1H, s, H-9).

2. 산사나무(*C. oxyacantha*) 잎의 성분분리

낙엽, 교목으로 우리나라에는 8종의 산사나무속 식물이 자생하며, 잎은 어긋나며, 깃 모양으로 얇게 갈라지고, 가장자리는 거친 톱니가 있고, 꽃은 산형화서, 5월에 백색 과실은 이과로 둥근 모양이다. 우리나라에서는 산사나무속 식물의 성숙한 과실을 채취, 건조하여 산사자 (*Crataegi Fructus*)라하여 건위, 소화, 정장약으로 사용하고 있다. 유럽산 산사나무 (*C. oxyacantha*, *C. curvisepala*)는 잎과 꽃의 추출물을 순환기 질환인 고혈압, 협심증, 관상동맥 경화증, 고 cholesterol혈증 등의 치료에 사용하고 있다. 이것으로부터 성분들을 분리, 순환기치료용으로 사용할 수 있는 계기를 마련하고자 한다.

가. 물질의 분리

1) 용매분획

산사나무 잎(충남 공주)을 채취하여 에탄올로 추출, 여과, 감압농축하여 에탄올 엑스 (401g)을 얻었다. 에탄올 엑스를 물 10리터에 현탁하고 메틸렌디클로라이드, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 용매분획하였다. 각 분획물을 농축하여 분획물 엑스를 만들었다 (Fig. 7).

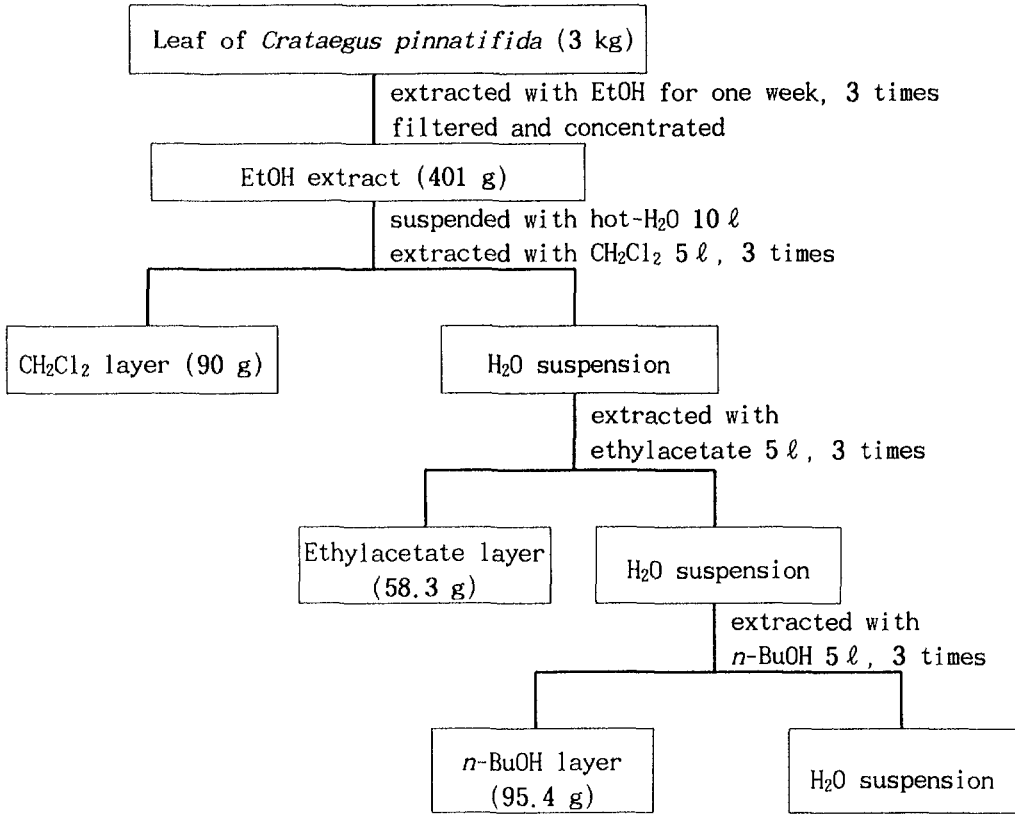


Fig. 7. Isolation of constituents from the leaves of *Crataegus pinnatifida*.

2) 성분분리

메틸렌클로라이드 분획물(90g)을 실리카젤 컬럼 크로마토그래피로 분리, Fr. 1에서 9까지를 얻고(Fig. 8), Fr. 3에서 compound 1을 Fr. 7에서 compound 2를 얻었다.

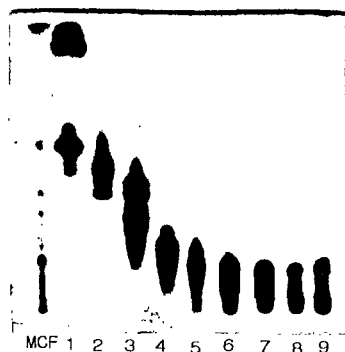
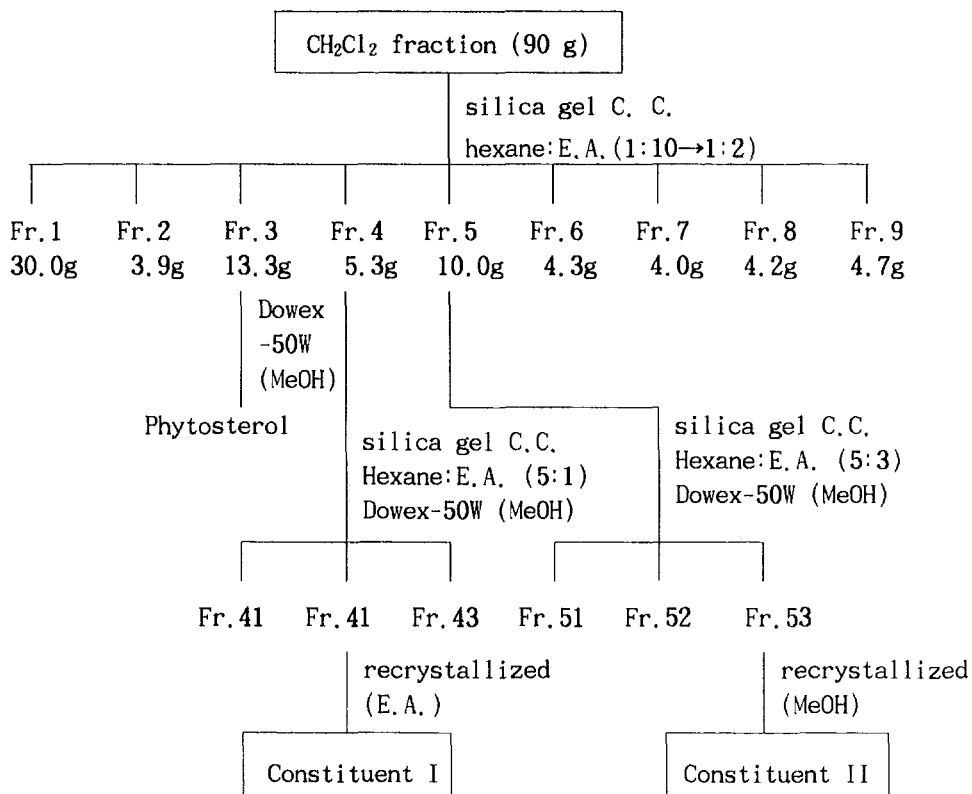
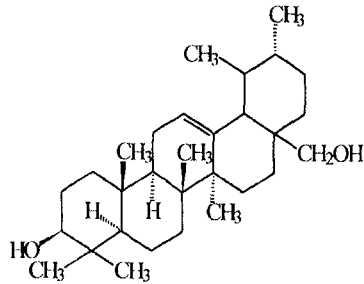


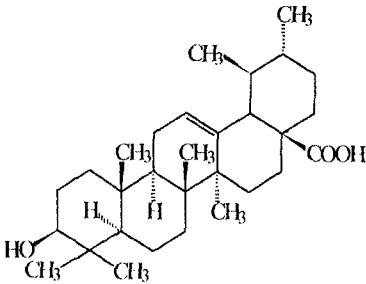
Fig. 8. TLC of solvent fractionation (MCF-1~9) of CH₂Cl₂ fraction. Plate : pre-coated TLC plate silica gel GF₂₅₄ (Merck); Developing solvents : *n*-hexane : acetone = 5 : 2; Detection : UV 254 nm, 10% sulfuric acid; MCF : CH₂Cl₂ fraction.

3) 분리된 성분의 화학구조

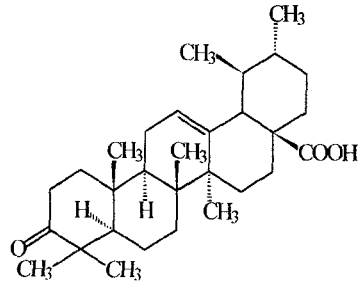
분리한 물질의 화학구조는 아래와 같았으며, compound II를 산화시켜 compound III을 얻었다.



Compound I



Compound II



Compound III

Compound III 합성 - compound II 100 mg (0.2 mM)을 1ml의 메칠렌클로라이드과 아세톤 동량 혼합 으로 현탁화 시킨 후 5°C를 유지하면서 1ml의 Jones 시액을 넣고 45분간 교반시키고, 여기에 iso-PrOH 0.1 ml와 물 0.4 ml를 넣고 실온을 유지 하면서 10분간 교반시킨다. 반응액에 물 10ml 메칠렌클로라이드 10 ml를 넣고 추출 한 후 메칠렌클로라이드층을 10 ml의 포화 NaCl용액으로 세척하고 메칠렌클로라이드층을 건조하여 silica gel column chromatography (용매조건: 헥산- 아세톤= 5:2)를 실시하여 Compound III(3-oxours-12-ene-28-oic acid) 65 mg을 얻었다.

Compound I- 무색침상 결정 (306.8 mg), MP: 214-216°C

Liebermann-Buchard 반응: 양성 (적색)

$$[\alpha]_D^{25} : +56^\circ \quad (c=1.00, \text{EtOH})$$

IR ($\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹): 3350(-OH), 2910, 1450, 1360

¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): C1 37.4, C2 25.4, C3 76.8, C4 37.4, C5 54.6, C6 17.8, C7 32.3, C8 38.3, C9 47.0, C10 36.3, C11 17.1, C12 123.9, C13 138.5, C14 41.4, C15 26.8, C16 22.9, C17 47.0, C18 53.6, C19 38.2, C20 38.2, C21 30.2, C22 35.1, C23 28.0, C24 15.7, C25 15.3, C26 16.3, C27 22.5, C28 67.9, C29 22.8, C30 21.1

Compound II- 무색분말 결정 (976.5 mg), MP: 261-263°C

Liebermann-Buchard 반응: 양성 (적색)

$$[\alpha]_D^{25} : +63^\circ \quad (c=1.00, \text{EtOH})$$

IR ($\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹): 3400 (-OH), 2920, 1680 (-CO), 1450, 1380

¹³C-NMR (CDCl₃, ppm): C1 38.1, C2 26.9, C3 76.8, C4 36.5, C5 54.7, C6 17.8, C7 32.6, C8 38.7, C9 46.7, C10 36.2, C11 16.7, C12 124.5, C13 137.9, C14 41.5, C15 27.4, C16 23.0, C17 46.8, C18 54.4, C19 38.4, C20 38.2, C21 30.1, C22 36.4, C23 28.1, C24 15.1, C25 15.8, C26 16.8, C27 23.1, C28 178.7, C29 22.7, C30 20.9

Compound III- 무색분말 결정, MP: 238-241°C

Liebermann-Buchard 반응: 양성 (적색)

$$[\alpha]_D^{25} : +87^\circ \quad (c=1.00, \text{EtOH})$$

IR ($\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹): 3400 (-OH), 2920, 1695 (-CO), 1680 (-CO), 1450, 1380

¹³C-NMR은 Table 3 참조

Table 3. ^{13}C -NMR spectral data of compound I, II and III
($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$, 75 MHz)

Carbon No.	Constituent I	Constituent II
1	37.4	38.1
2	25.4	26.9
3	76.8	76.8
4	37.4	36.5
5	54.6	54.7
6	17.8	17.8
7	32.3	32.6
8	38.3	38.7
9	47.0	46.7
10	36.3	36.2
11	17.1	16.7
12	123.9	124.5
13	138.5	137.9
14	41.4	41.5
15	26.8	27.4
16	22.9	23.7
17	47.0	46.9
18	53.6	52.2
19	38.2	38.4
20	38.2	38.2
21	30.2	30.1
22	35.1	36.4
23	28.0	28.1
24	15.7	15.1
25	15.3	15.8
26	16.3	16.8
27	22.5	23.1
28	67.9	178.3
29	22.8	22.7
30	21.1	20.9

3. 결과 및 고찰

유럽에서는 서양산사나무의 잎이나 꽃에서 유효성분군을 추출하여 혈액순환개선제로 사용하고 있으며 국내에서도 이러한 원료를 수입하여 제품화하여 시판하고 있다. 그러므로 국내에 널리 자생하고 있는 산사나무의 잎이나 꽃도 약용 자원화 할 수 있다고 판단된다. 본 실험에서 잎의 주성분으로 uvaol과 ursolic acid를 분리하였으며, 이들 물질들에 관한 약효학적 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 그리고 이들 성분을 표준으로 하여 품질평가의 기준을 삼을 수 있을 것으로 생각한다.

제 3 절 산사자의 성분 및 재래종 굴피류의 hesperidin의 naringin의 함량조사 (제 3차년도)

1. 산사나무 열매(山査子)의 성분연구

산사나무의 열매인 山査子는 예로부터 소화기 질환의 치료에 사용하여 왔으며 민간에서는 고혈압 치료에도 응용되고 있다. 특히 서양에서는 순환기 치료제로 사용되고 있는 점을 감안하여 성분연구에 착수하였다.

가. 물질의 분리

자료 2.53kg을 메탄올로 추출, 여과, 농축하여 메탄올엑스를 얻었다. 메탄올 엑스를 물에 현탁하고 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올로 용매 분획하고, 각 분획물을 농축한 뒤 헥산(13g), 에틸아세테이트(36g), 부탄올분획물(200g)을 만들었다.

헥산분획물을 실리카젤 컬럼크로마토그래피하여 분리한 물질은 15-nonacosanol, nonacosanol, 11,12-dimethoxy-3,4-furano-1,2-naphthoquinone, β -sitosterol이었고, 에틸아세테이트분획물을 실리카젤 컬럼크로마토그래피하여 분리한 물질은 3 β -acetoxy-ursolic acid, ursolic acid, 11,12-dimethoxy-3,4-furano-5-hydroxy-1,2-naphthoquinone, euscaptic acid, quercetin, symmetrical monomethyl ester of citric acid, β -sitosteryl-3-O-D-glucopyranoside, hyperin이었다.

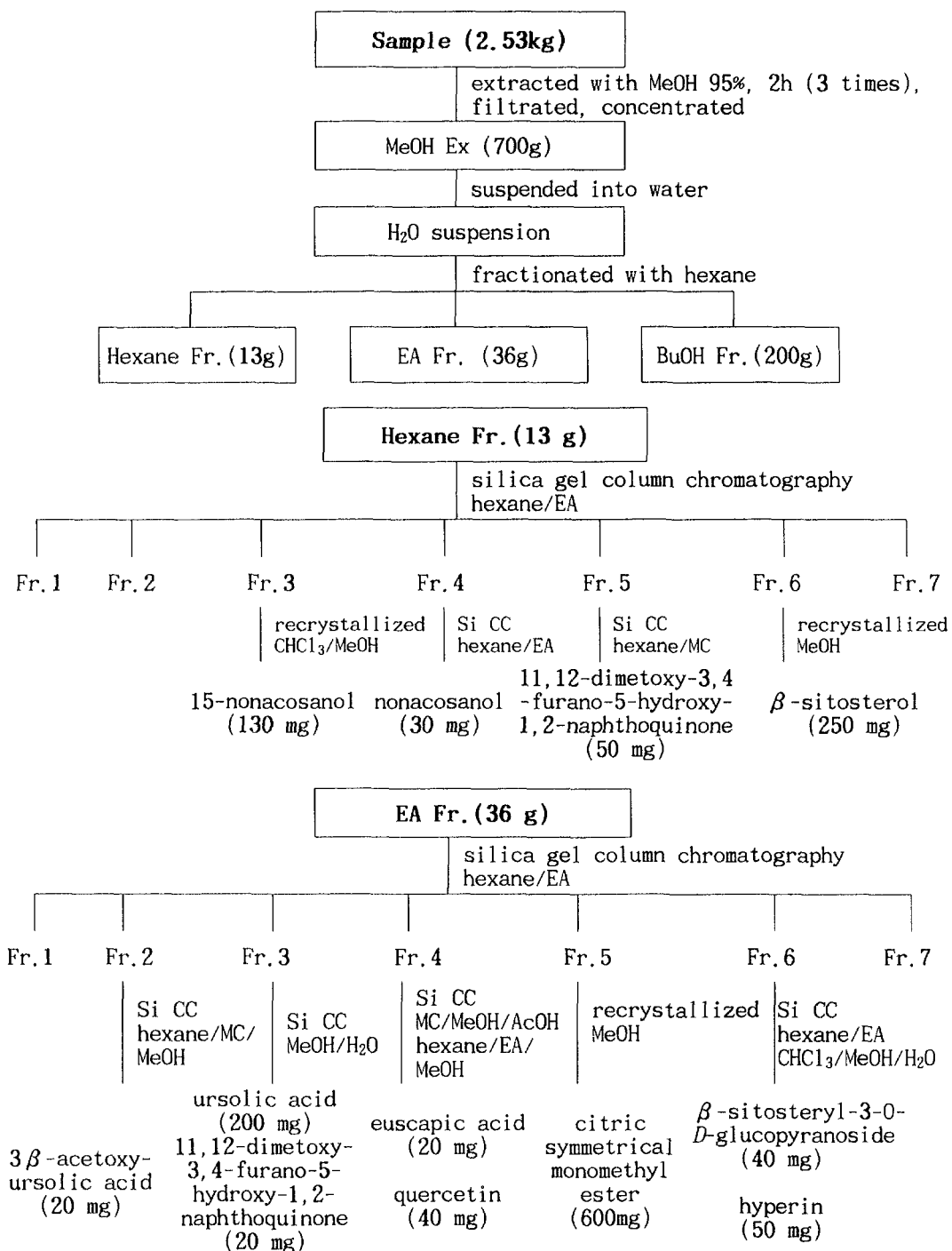
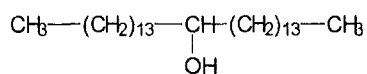


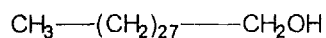
Fig. 9. Isolation of constituents from *Crataegus pinnatifida* (Si CC: silica gel column chromatography; EA: ethyl acetate; MC: methylene chloride)

나. 분리한 물질들의 화학구조

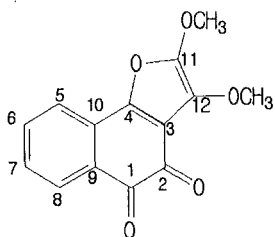
분리한 물질들은 물리화학적인 각종 기기에 의한 spectral data에 의거 아래와 같이 화학구조를 규명하였다. 분리한 물질들은 15-Nonacosanol, Nonacosanol, 11,12-dimethoxy-3,4-furano-1,2-naphthoquinone, β -sitosterol, 3 β -acetoxy-ursolic acid, Euscaptic acid, Quercetin, Hyperin, Ursolic acid, Citricsymmetricalmonomethylester, 11,12-dimethoxy-3,4-furano-5-hydroxy-1,2-naphthoquinone, β -sitosteryl-3-O-D-glucopyranoside 이었다.



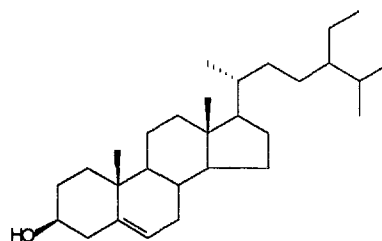
15-Nonacosanol



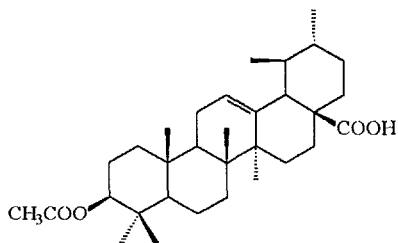
Nonacosanol



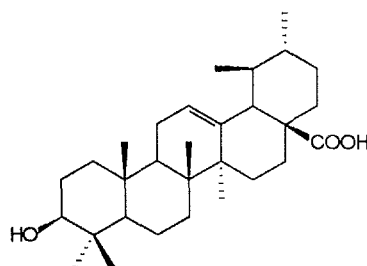
11,12-dimethoxy-3,4-furano-1,2-naphthoquinone



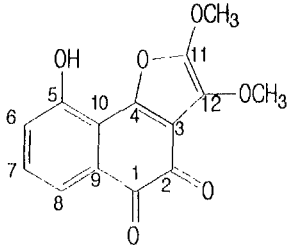
β -sitosterol



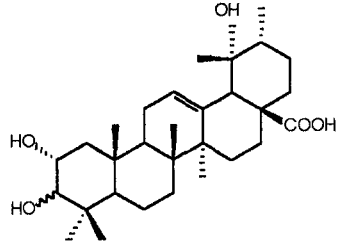
3 β -acetoxy-ursolic acid



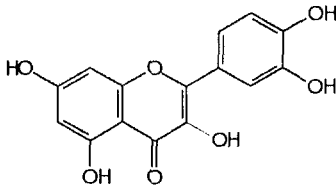
Ursolic acid



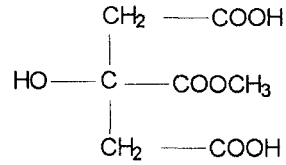
11,12-dimethoxy-3,4-furano-5-hydroxy-
1,2-naphthoquinone



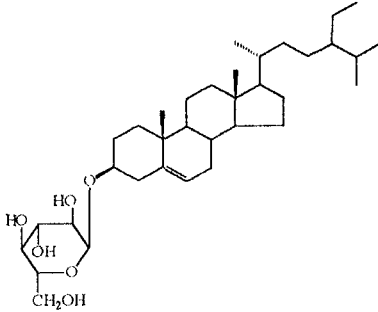
Euscaptic acid



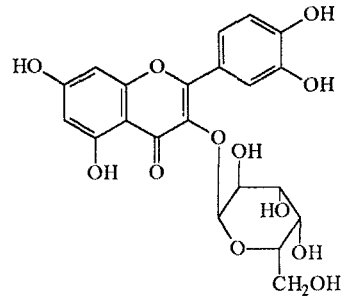
Quercetin



Citric symmetrical monomethyl ester



β -sitosterol-3-O-D-glucopyranoside



Hyperin

다. 결과

산사자로부터 12개의 물질을 분리하여 화학구조를 규명하였으며 이들 물질 가운데서 11,12-dimethoxy-3,4-furano-1,2-naphthoquinone 과 11,12-dimethoxy-3,4-furano-5-hydroxy-1,2-naphthoquinone은 새로운 물질이다. 이 물질의 화학구조 규명과 약효에 관하여는 Planta Medica에 투고할 예정이다.

2. 감귤류 근연식물 열매의 hesperidin 함량조사

Hesperidin은 감귤 뿐 만 아니라 운향과의 근연식물의 열매 껍질에도 함유되어 있는지를 알아보기 위하여 본 실험에 착수하였다. 결과에 따라서는 순환기치료 자원으로 활용할 수도 있을 것이라 판단하였기 때문이다.

가. 재료

본 실험에서는 제주에서 나는 재래 감귤인 인창귤, 사두감, 제주레몬, 유자를 공기중에서 음건한 후 증말 및 세말하여 사용하였다.

나. 실험방법

1) 검액의 제조

각각의 시료를 가루로 한 후 그중 2.5g씩을 정밀히 취해 메탄올 50ml를 가하여 수욕상에서 6시간동안 환류추출 하였다. 실온에서 식힌 다음 여과하고 메탄올을 가해 50ml로 하였다. 이 액을 다시 5배 희석하고 여과한 후 검액하였다. 이 과정을 3회 반복하였다.

2) 표준액의 제조

Hesperidin 표준품을 1mg/ml 용액으로 만들고 이 액을 계열 희석하여 각각 62.5, 125, 250, 500 μ g/ml가 되도록 조제하여 검량선을 작성하였다.

3) HPLC 분석조건

Column: NovaPak C18, Column 온도: 48 $^{\circ}$ C, 검출기: 자외부 흡광광도계 (측정파장 280nm), 이동상: 메탄올 : 물 = 27 : 73, 유속: 1.0ml/min, 주입량: 5.0 μ l.

4) 검량선

검량선은 각 표준용액 5 μ l씩을 취해 위의 조건으로 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 peak 면적과 표준용액 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다. 그 결과 $y = 9571.5x + 159464$ ($R^2 = 0.9903$)의 직선을 나타내었다 (Fig. 10).

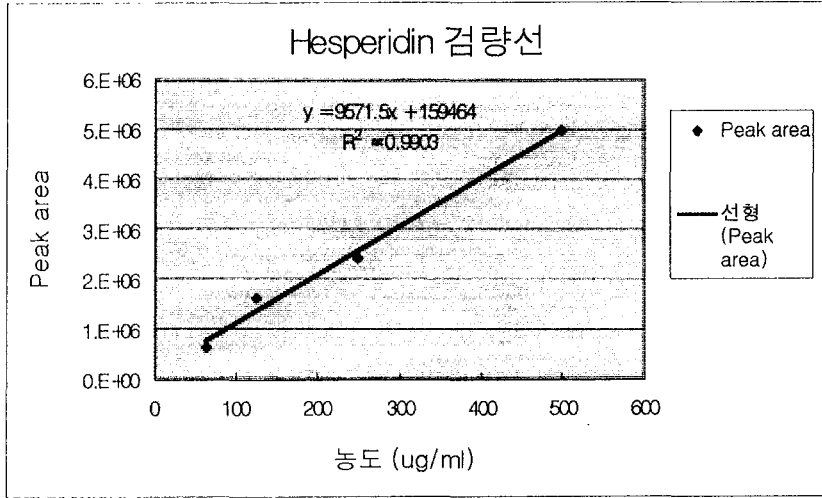


Fig. 10. Hesperidin 검량선.

다. 결과

함량 정량은 검액 5 μ l씩을 정확히 취하여 위의 조건에서 실험하였다. 검액에서 얻은 hesperidin의 peak 면적을 검량선에 대입하여 hesperidin의 양을 구하고 각 시료들의 hesperidin 함량을 구했다 (Table.1). hesperidin 함량을 기준으로 볼 때, 사두감과 인창굴은 감귤 보다 함량이 높았고 레몬, 유자는 함량이 낮았다. 그러므로 사두감의 육정이 유망하다고 생각된다.

$$\text{hesperidin함량(\%)} = \frac{\text{검액중 hesperidin의 양 (mg/ml)}}{\text{건조된 시료의 양 (mg/ml)}} * 100$$

Table 4. The contents of hesperidin

	1회	2회	3회	평균 (%)
유자	0.39	0.45	0.44	0.43
진감	1.72	1.61	1.52	1.62
오렌지	2.93	2.70	1.91	2.51
탱자	0.00	0.00	0.00	0.00
하귤	0.00	0.00	0.00	0.00
청귤	3.25	3.43	2.74	3.14
인창굴	2.45	2.55	2.50	2.50
사두감	3.33	3.67	3.51	3.56
레몬	1.00	0.77	0.81	0.89

제 4 절 성숙기에 있어서 감귤류의 성분변화 (제 4차년도)

감귤 및 근연식물의 열매에 함유된 hesperidin과 naringin이 성숙기 (9, 10, 11 월)에 있어서 함량에 어떤 변화가 있는지를 알아보기 위하여 본 실험에 착수하였다. 이들 유효성분이 가장 많이 함유된 시기에 채취하는 것이 약효 발휘에 좋을 것으로 판단하였기 때문이다.

1. 실험재료

실험에 사용한 것은 다음과 같다.

당유자(*Citrus grandis* OSBECK)

병귤(*C. platyamma* Hort. ex Tanaka)

빈귤(*C. leiocarpa* Hort. ex TANAKA)

삼보감(*C. sulcata*)

지각(*C. aurantium* LINN)

감귤(*C. unshiu* MARKOVICH)

편귤(*C. tangerina* Hort. ex Tanaka)

하귤(*C. natsudaidai*)은

2. 채취시기 및 장소

1999년 9월 15일 (서귀포, 제주감귤연구소)

1999년 10월 17일 (서귀포, 제주감귤연구소)

1999년 11월 20일 (서귀포, 제주감귤연구소)

3. 검액의 제조

과피를 벗겨 음건한 것을 증말 및 세말한 후 다시 데시케이터안에 넣어 48시간 건조시킨 후 실험에 사용하였다. 각각의 시료를 2.5g씩 정밀히 취해 HPLC용 methanol 50 ml를 가하여 수욕상에서 6시간 환류추출하였다. 실온에서 식힌 후 여과하고

methanol을 가해 전체를 50ml로 하였다. 이 액을 검량선 범위 안에 들도록 하기위해 다시 5배 희석하고 PVDF syringe filter (0.45 μ m)로 여과한 후 검액하였다. 이 과정을 3회 반복하였다.

가. 표준액의 제조

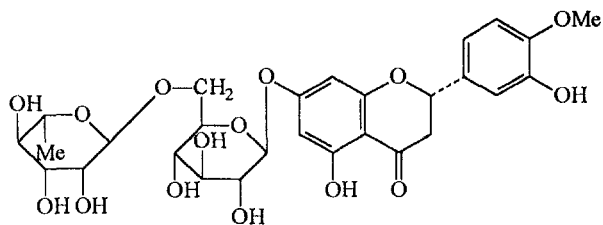
Hesperidin 표준품은 일본 Nakarai사에서 구입하였고, naringin 표준품은 Sigma사에서 구입한 것을 사용하였다. 이들 표준품을 methanol에 녹여 1mg/ml 용액을 만들었고, 이 용액을 계열 희석하여 500, 250, 125, 62.5 μ g/ml가 되도록 조제하고 PVDF syringe filter (0.45 μ m)로 여과한 후 검량선을 작성하였다.

나. HPLC에 의한 정량분석

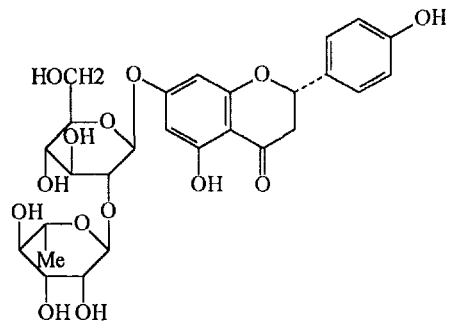
HPLC 분석은 Nova-Pak C₁₈(3.9 \times 150mm, Waters) column을 이용하여 표준 hesperidin 및 naringin과 비교하여 정량분석 하였다. 이동상으로 methanol-water(27:73)을 이용하였고, 유속은 0.8ml/min, column 온도는48 $^{\circ}$ C로 하였으며, 주입량은 5 μ l로 하여 UV 280nm에서 각 성분들을 검출하였다.

다. 결과 및 고찰

Hesperidin 및 naringin 표준액을 실험방법의 조건으로 HPLC를 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 peak 면적과 표준용액 농도를 변수로 하여 각각의 검량선을 작성하였다. 그 결과 hesperidin은 $y=9571.5x+159464$ ($r=0.9951$)의 직선성을 나타내었고, naringin은 $y=10045x+5476.6$ ($r=0.9999$)의 직선성을 나타내었다 (Fig. 1).

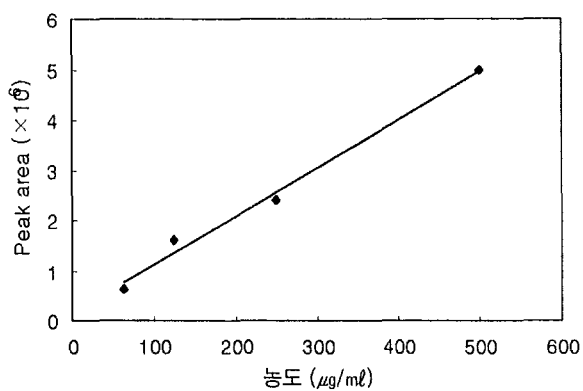


Hesperidin



Naringin

Hesperidin 검량선



Naringin 검량선

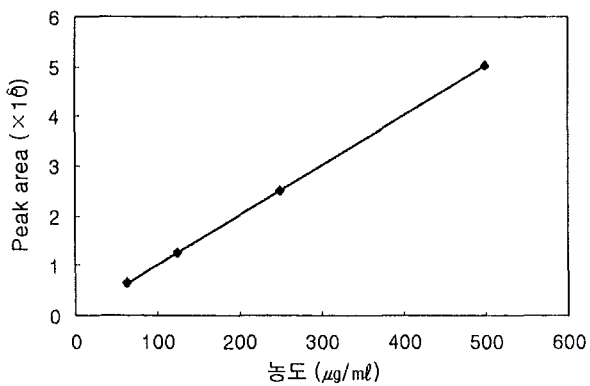


Fig. 11. Calibration curves of hesperidin and naringin by HPLC.

HPLC 분석결과 hesperidin의 retention time은 8.2분 정도였고 naringin은 6.8분 정도에 peak가 나타났다. 이를 기준으로 검액중의 hesperidin과 naringin 함량을 구하였다. 그 결과 병귤, 빈귤, 삼보감, 청귤등은 8.2분 정도에 peak가 나타났으므로 이들 과피중에는 hesperidin이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 한편 당유자, 지각, 편귤, 하귤등은 분석결과 6.8분 정도에 peak가 나타난 것으로 보아 이들 과피중에는 naringin이 함유되어 있다는 것을 알아내었다. 9월, 10월 및 11월에 채취한 시료에 대해 각 검액을 분석하여 얻은 peak 면적을 hesperidin 및 naringin 검량선에 대입하여 농도를 구하고 각 시료들의 hesperidin 및 naringin 평균함량과 표준편차를 구했다 (Table 1).

Table 5. The contents of hesperidin and naringin in the peels of *Citrus* plants.

	Hesperidin(%)			Naringin(%)		
	9월	10월	11월	9월	10월	11월
당유자	-	-	-	3.37±0.29	3.77±0.23	3.36±0.04
병귤	2.25±0.11	1.47±0.30	0.85±0.09	-	-	-
빈귤	0.60±0.09	0.57±0.07	1.31±0.01	-	-	-
삼보감	3.01±0.86	2.69±0.18	2.37±0.01	-	-	-
지각	-	-	-	2.48±0.04	2.81±0.38	4.62±0.01
감귤	5.38±0.11	4.54±0.68	3.02±0.01	-	-	-
편귤	-	-	-	0.71±0.01	0.90±0.08	1.87±0.04
하귤	-	-	-	2.80±0.30	2.79±0.01	1.93±0.01

* Standard deviations were calculated from every triplicated measurements.

Table 5에서 보는 바와 같이 종에 따라 과피중의 주성분 함량이 다르다는 것을 알 수 있는데 병귤, 빈귤, 삼보감 그리고 청귤의 과피중에는 hesperidin이 함유되어 있었고 당유자, 지각, 편귤과 하귤에는 naringin이 함유되어 있었다. 또한 그 함량도 차이가 났는데 hesperidin의 경우 9월에 채취한 청귤피에서 평균 5.38±0.11%로 가장 높게 나타났고, 그다음 삼보감, 병귤, 빈귤 순으로 hesperidin을 함유하는 것으로 나타났다. Naringin의 함량을 살펴보면 11월의 지각에서 가장 높았고(4.62±0.01%) 당유자, 하귤 그리고 편귤 순으로 naringin이 함유되어 있었다.

열매의 성숙도에 따른 각 성분들의 함량 변화를 비교해 보았다 (Fig. 12). 병귤,

삼보감 그리고 청귤은 열매가 익기 전 과피에 hesperidin이 더 많이 함유되어 있었으나 빈귤은 익기 전보다 익을 무렵에 더 많은 hesperidin이 함유되어 있었다. Naringin의 함량변화를 살펴보면 당유자의 경우 익기 전과 후의 함량변화가 거의 없었으나 나머지는 차이를 나타내었다. 지각과 편귤의 과피 중에는 익기 전보다 익을 무렵에 naringin 함량이 더 많았다. 반면에 하귤은 익기 전 과피가 익을 무렵보다 naringin을 더 많이 함유하고 있었다.

이 결과를 통해 성숙도에 따라 과피 중의 주성분 함량이 달라짐을 알 수 있었다. 즉 병귤, 삼보감, 청귤과 하귤은 열매가 성숙함에 따라 그 주성분인 hesperidin 및 naringin 함량이 감소될 것이라고 생각되나 빈귤과 지각, 편귤의 경우에는 성숙도에 따라 주성분의 함량이 증가될 것이라고 추측하였다. 당유자의 경우 naringin의 함량 변화가 거의 없는 것으로 보아 성숙도에 관계없이 일정하게 주성분을 함유할 것이라고 추측되었다.

4. 결론

Hesperidin 및 naringin을 지표물질로 하여 제주 재래 감귤류 8종에 대해서 HPLC로 함량분석을 실시한 결과 청귤은 각각 $5.38 \pm 0.11\%$ (9월), $4.54 \pm 0.68\%$ (10월) 및 $3.02 \pm 0.01\%$ (11월)로 가장 많은 hesperidin을 함유하는 것으로 나타났고 삼보감은 $3.01 \pm 0.86\%$ (9월), $2.69 \pm 0.18\%$ (10월) 및 $2.37 \pm 0.01\%$ (11월), 병귤은 $2.25 \pm 0.12\%$ (9월), $1.47 \pm 0.30\%$ (10월) 및 $0.85 \pm 0.01\%$ (11월), 빈귤은 $0.60 \pm 0.01\%$ (9월), 0.57 ± 0.07 및 $1.31 \pm 0.01\%$ (11월)의 hesperidin을 함유하였다. 또한 naringin 함량은 당유자와 지각에서 높은 것으로 나타났는데, 각각 $3.37 \pm 0.29\%$ (9월), $3.77 \pm 0.23\%$ (10월), $3.36 \pm 0.04\%$ (11월)와 $2.48 \pm 0.04\%$ (9월), $2.81 \pm 0.38\%$ (10월), $4.62 \pm 0.01\%$ (11월)의 naringin을 함유하고 있었다. 하귤은 $2.80 \pm 0.31\%$ (9월), $2.79 \pm 0.01\%$ (10월) 및 $1.93 \pm 0.01\%$ (11월), 편귤은 $0.71 \pm 0.01\%$ (9월), $0.90 \pm 0.08\%$ (10월) 및 $1.09 \pm 0.01\%$ (11월)의 naringin을 함유하는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 종과 성숙도에 따라 주성분인 hesperidin 및 naringin 함량이 달라짐을 알 수 있었다. 병귤, 삼보감, 청귤 그리고 하귤은 열매가 성숙함에 따라 주성분인 hesperidin 및 naringin 함량이 감소된다고 생각되므로 이들은 열매가 성숙하기 전에 채취하는 것이 약리적으로 유효한 생약을 얻기 위해 바람직하겠으나 빈귤 그리고 지각, 편귤은 열매가 성숙하면서 주성분인 hesperidin 및 naringin 함량이 증가된다고 여겨지므로 이 경우에는 성숙한 열매의 과피를 이용하는 것이 바람직하겠다.

귤나무속 식물들은 그 열매를 식용 및 약용으로 많이 이용하므로 병충해에도 저항성

이 있고 수확량도 많은 새로운 우수한 품종이 개발되고 있다. 이러한 관점에서 제주도 재래 감귤류는 오랫동안 이 섬의 풍토에 적응되어왔고 본 실험에서도 알 수 있듯이 중요한 약리 작용을 나타내는 hesperidin 및 naringin을 함유하고 있으므로 새로운 품종 개발에 중요한 자원이 되리라 생각한다.

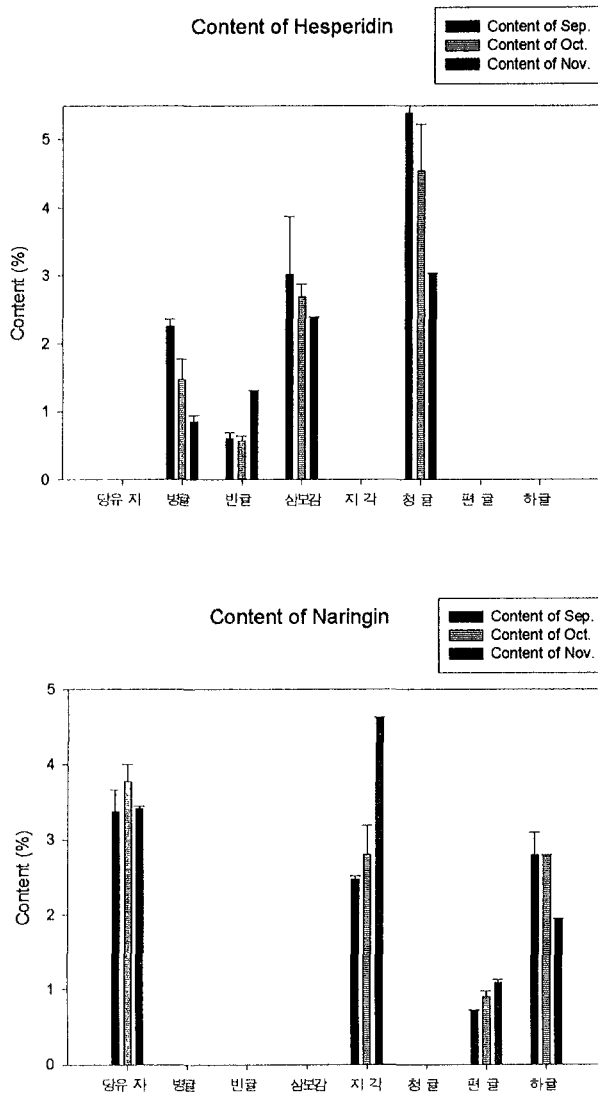


Fig. 12. Quantitative comparison of hesperidin and naringin from the peels of *Citrus* plants in Cheju island.

여 백

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 위탁연구는 제1차년도(1995년)부터 제4차년도에 걸쳐서 수행되었으며, 연구개발목표 및 내용 및 범위는 Table 1과 같으며 계획대로 연구성과를 거둘 수 있었다.

제 1차년도에서는 심혈관 예방 및 치료용 자원확보를 위한 조사와 가능성을 타진하여 감귤, 오미자 및 산사자로 확정하였으며 감귤에 함유된 유효성분의 추출조건을 확립하였다.

제 2차년도에서는 심혈관 질환 예방 및 치료를 위한 유효성분을 조사하기 위하여 오미자 및 산사나무의 잎에 함유된 성분을 분리, 화학구조를 규명하였다.

제 3차년도에서는 자원확보 및 수입대체 가능성을 타진할 목적으로 산사자(山査子)의 성분을 연구하여 새로운 물질 2개의 구조를 규명하였고, 감귤의 근연식물에 hesperidin이 함유되어 있는 지 확인하였다.

제 4차년도에서는 성숙기에 있어서 감귤에 함유되어 있는 hesperidin과 naringin의 함량변화를 연구하였다. 푸른 귤의 열매도 약용으로 할 수 있다는 것과 근연식물의 열매도 약용가치가 높다는 것을 확인할 수 있었다.

Table 6. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
제1차년도 (1995-1996)	자원확보 및 순환기 약품 개발 가능성 타진	순환기 농산물(생약) 조사와 선정 감귤 유효성분 추출조건 확정
제2차년도 (1996-1997)	신규 순환기 의약품 창출을 위한 성분조사	오미자, 산사나무 잎의 성분연구
제2차년도 (1997-1998)	자원확보 및 수입대체 가능성 타진	산사나무열매(산사자) 성분연구 감귤 및 근연식물 열매의 hesperidin 함량조사
제4차년도 (1998-1999)	산업화에 대비한 원료확보, 채취시기 결정	성숙기에 있어서 감귤의 유효성분 함량변화

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 감귤의 껍질에서 분리한 플라보노이드 추출물을 사용하여 새로운 순환기질병의 예방 및 치료 의약품이 탄생될 수 있으며 국민보건에 이바지할 것이다.
2. 신약창출이 되면 원료공급을 위한 감귤의 확대생산이 예상되므로 제주도의 농가소득 증대에 크게 이바지할 것으로 판단된다.
3. 기술소유권을 획득하거나 출원 중에 있으므로 수익성을 보장 받을 수 있으며, 신약창출을 통한 기술적 자신감, 새로운 차원의 확신감, 또한 전문가 양성의 가능성이 커지고 선진국의 신기술 이전 기피에 따른 문제점을 해결 할 수 있을 것으로 판단된다.

연구결과의 일부는 연구책임자인 복성해 박사를 비롯한 공동연구자들이 국제학술잡지에 투고하였거나 할 예정이다.

1. Bok, S. H., Lee, S. H., Park, Y. B., Son, K. H., Jeong, T. S., Choi, M. S., **Bae, K.** (1999) Plasma and Hepatic Cholesterol and Hepatic Activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase and Acyl CoA:Cholesterol Transferase are Lower in Rats fed Citrus Peel Extract or a Mixture of Citrus Bioflavonoids, Journal of Nutrition, Vol 129, In press.
- 2 Lee, S., Park, Y., **Bae, K.**, Bok, S., Kwon, Y., Lee, E., and Choi, M., Cholesterol lowering activity of naringenin via inhibition of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl Co A reductase and acyl Co A:Cholesterol acyltransferase in rats, Nutrison and Metabolism, 43, 173-180 (1999).
3. Shin, Y. W., Bok, S. H., Jeong, T. S., **Bae, K.**, Jeoung, N. H., Choi, M. S., and Park, Y. B. (1999) Hypocholesterolemic Effect of Naringin Associated with Hepatic Cholesterol Regulating Enzyme Changes in Rats, International Journal of Vitamin and Nutrition, Accepted, 1999.
4. 배기환, 나민균, 복성해, 성숙기에 있어서 감귤 성분의 함량 변화, 한국생약학회, 투고예정

제주도에서 생산되는 감귤은 한해 약 70-80만톤이 생산되고 있다. 알맹이는 식용으

로 사용되고 있으나 껍질은 대부분 폐기물로 처리되고 있다. 그러나 hesperidin, naringin 등 약효성분은 껍질에 포함되어 있다. 그러므로 유효성분들을 추출하여 순환기 질병의 예방 및 치료제로 활용하고자 하는 것이 본 연구의 핵심이다. 감귤의 껍질에서 추출한 hesperidin, naringin 등을 포함하는 추출물은 혈액 속에 존재하는 콜레스테롤의 양을 감소시키는 실험결과가 나왔다. 그러므로 우선 건강식품 또는 기능성식품으로 개발하고, 다음에 몇 가지 유효성분을 중심으로 순환기계 치료약으로 개발될 수 있을 것으로 생각된다. 이와 같은 용도로 사용하기 위하여 제일 문제가 되는 것은 귤껍질에 남아있는 농약이 문제가 될 것이므로 이의 해결책이 있어야 할 것으로 생각된다.

제 6 장 참고문헌

1. 陸昌洙, 亞細亞生藥圖鑑, 1997년, 도서출판 경원, 서울, p. 305.
2. Trease, G. E. and Evans, W. C. (1985) *Pharmacognosy* 12th edition, 428-429. Bailliere Tindall, London.
3. Trease, G. E. and Evans, W. C. (1985) *Pharmacognosy* 12th edition, 412. Bailliere Tindall, London.
4. Wacker, A. and Eilmes, H. G. (1978) Antiviral activity of plant components. 1st communication: Flavonoids. *Arzneimittelforschung*. 28: 347-350.
5. Hisayuki, H., Yuki, O., Yoshio, T., Toshio, M., Akira, U., Tizuko, K. and Setsuo, H. (1992) Studies on natural antioxidants in *Citrus* species. I. Determination of antioxidative activities of Citrus fruits, *Chem. Pharm. Bull.* 40: 1940-1942.
6. Mario, C., Luc, P., Arnold, V. and Dirk, V. B. (1996) Inhibition of bacterial mutagenesis by *Citrus* flavonoids. *Planta Medica*. 62: 222-226.
7. Yang, M. Z., Tanaka, T., Hirose, Y., Deguchi, T., Mori, H. and Kawada, Y. (1997) Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Inter. Journal of Cancer*. 73: 719-724.
8. Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T. and Ogawa, H. (1997) Chemoprevention of Azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*. 18: 957-965.
9. Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Fukutani, K. and Ogawa, H. (1997) Chemoprevention of 4-Nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination, *Cancer Research*. 57: 246-252.
10. Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Fukutani, K. and Ogawa, H. (1997), Modulation of

- N-methyl-N-amyl nitrosamine-induced rat oesophageal tumourigenesis by dietary feeding of diosmin and hesperidin, both alone and combination. *Carcinogenesis*, 18: 761-769.
11. Shin, W. C., Kim, S. J., Shin, J. M. and Kim, S. H. (1995) Structure-taste correlations in sweet dihydrochalcone, sweet dihydroisocoumarin, and bitter flavone compounds. *J. Med. Chem.* 38: 4325-4331.
 12. Ahn, S. H. (1986) Studies on antimicrobial activities of natural naringin and its hydrolysate. Thesis of M. S., Chungbuk Nat. Univ. 1-17.
 13. Mario, C., Luc, P., Arnold, V. and Dirk, V. B. (1996) Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Medica*, 62: 222-226.
 14. Gordon, P. B., Holen, I. and Seglen, P. O. (1995) Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid. *J. Bio. Chem.* 270: 5830-5838.
 15. Honkakoski, P. and Negishi, M. (1998) Protein serine/threonine phosphatase inhibitors suppress phenobarbital-induced Cyp2b10 gene transcription in mouse primary hepatocytes. *Biochemical J.* 330: 889-895.
 16. Kefford, J. E. (1959) The chemical constituents of Citrus fruits. *Advan. Food. Res.* 9: 285-372.