

최 종  
연구보고서

**식·약용 생물자원 함유 고령화 질환 예방 및  
치료용 미량소재의 실용화**

**Practical Utilization of Preventive and Curing  
Micro-material of Senile Infirmary from the Edible  
and Pharmaceutical Resources**

뇌기능 신경전달물질 분해효소 저해 미량소재의 실용화  
Practical Utilization of Acetylcholinesterase Inhibitor from  
Micro-material

뇌기능 신경전달물질 합성효소 활성화 미량소재의 실용화  
Practical Utilization of Choline Acetyltransferase Activator from  
Micro-material

외인성 피부노화 제어 미량소재의 실용화

Practical Utilization of Micro-material for Anti-photoaging

비만·당뇨 예방용 glucose uptake 조절 미량소재의 실용화  
Practical Utilization of Intestinal Glucose Uptake Inhibitor from  
Micro-material

고려대학교  
(한서대학교, 한일인삼산업 (주))

농 립 부

## 최종보고서

2000 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 식·약용 생물자원 함유 고령화 질환 예방 및 치료용 미량소재의 실용화에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출 합니다.

첨부: 1. 최종 보고서 10부

2. 최종 보고서 디스켓 1매

2003. 7. 29.

주관연구기관 : 고려대학교

총괄연구책임자: 신 동 훈 (인)

주관연구기관장: 고려대학교 총장

농림부장관 귀하

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식·약용 생물자원 함유 고령화 질환 예방 및 치료용 미량소재의 실용화에 관한 연구” 과제 (세부과제 “뇌기능 신경전달물질 분해효소 저해 미량소재의 실용화에 관한 연구”, “뇌기능 신경전달물질 합성효소 활성화 미량소재의 실용화에 관한 연구”, “외인성 피부노화 제어 미량소재의 실용화에 관한 연구”, “비만·당뇨 예방용 glucose uptake 조절 미량소재의 실용화에 관한 연구”) 의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 7월 29일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 신동훈

세부연구책임자 : 신동훈

세부연구책임자 : 조홍연

세부연구책임자 : 홍범식

연구 원 : 정낙철

연구 원 : 허호진

연구 원 : 이유현

연구 원 : 호진영

연구 원 : 김미정

연구 원 : 이상용

연구 원 : 이대희

연구 원 : 임계현

연구 원 : 임성훈

연구 원 : 서영순

연구 원 : 김유태

연구 원 : 정보영

협동연구기관명 : 한서대학교

협동연구책임자 : 김혜경

# 요 약 문

## I. 제 목

식·약용 생물자원 함유 고령화 질환 예방 및 치료용 미량소재의 실용화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 국민생활 수준의 향상과 더불어 의학기술이 고도로 발달함에 따라 노인의 인구가 증가되어 인구의 고령화 현상이 두드러지게 나타나고 있다. 우리나라의 경우 평균 수명 (1998년 현재 74세)의 연장 및 출산율의 저하로 인해 전체 인구에서 고령화 인구가 차지하는 비율이 증가되어 1955년에는 전체인구 중 65세 이상의 노인 인구가 3.7%이었으나, 2000년 6.8%, 2030년 14.0%로 예상되고 있으며 미국의 경우도 1900년의 4.7%가 2000년 15%이상으로 예상되고 있다. 이러한 고령화 현상과 함께 국제경쟁력을 확보하기 위하여 조직사회의 구성원들에게 치열한 경쟁을 요구함으로써 이들로 인한 성인병의 발병률이 급격한 증가 추세를 보이고 있다. 사망원인 또한 대표적인 성인병인 순환기계 질환, 암, 간장 질환에 의한 사망비율이 전체의 절반을 넘기기에 이르렀다. 이에 따라 국민들도 고령화 사회를 인식하게 되었고, 건강하게 장수하고자 하는 욕구가 커지면서 “고령화병과 성인병은 현대의 의료기술로 완치할 수 없다”는 불안감을 갖게 됨과 동시에 일상생활을 통한 예방에 관심이 높아질 것으로 예견되고 있다.

본 연구그룹이 선정한 식·약용류 (양념채소류 및 전통차·죽류)는 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 많았던 작물로서 과거 빈번한 수요·공급의 불균형으로 농산물 가격의 등락과 생산 농민의 영농의욕을 떨어뜨려 경제적, 사회적 문제로 대두되기도 하였다. 식·약용류 (양념채소류 및 전통차·죽류)의 가격안정을 통한 생산량 증대와 경쟁력을 갖는 하나의 산업종으로 육성하기 위해서는 이들로부터 고부가가치성 물질의 개발과 제품화가 전제되어야 한다. 뿐만 아니라 WTO 체제의 출범으로 인한 시장개방 아래에서 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 식용 농·임산자원을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 따라서 본 연구는 국내산 식·약용 생물자원을 대상으로 고령화병과 성인병의 대표적 질환인 노인성 치매, 피부노화, 비만, 당뇨의 예

방 또는 치료에 이용될 수 있는 미량성분을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 제품을 실용화함으로써 국내 농림산업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 식·약용 생물자원들로부터 약리·생리활성 성분을 의약 및 식품용 중간원료의 소재로 실용화하고 이를 주제로 한 기능성 식품을 개발하고자 하였다. 최종 목표에 도달하기 위해서 본 대표적인 고령화 질환에 따라 1, 2, 3 세부과제 및 제 4 세부과제 (협동과제)로 구분하였으며 이를 통하여 수행한 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

(1) 유자로부터 acetylcholinesterase 저해성분의 추출 정제, 구조해석 및 소재화를 연구개발 내용으로 하며 ICR-mouse를 이용한 *in vivo* assay계를 도입하여 인지능력과 독성 등을 검사하고 저해활성 물질의 실용화를 검토하는 것을 연구범위로 함

(2) 대추에서 cholineacetyltransferase 활성 성분을 추출 정제, 구조 해석 및 소재화를 연구개발 내용으로 하며 [<sup>14</sup>C] acetyl CoA를 이용한 *in vitro* assay계를 확립하고 ICR-mouse를 이용한 *in vivo* assay계를 도입하여 인지능력과 독성검사 등을 시행하여 활성화 성분 물질의 실용화를 검토하는 것을 연구범위로 함

(3) 두충으로부터 피부노화 제어를 위한 MMP-1 억제활성물질의 추출, 정제, 구조해석 및 소재화를 연구개발 내용으로 하며 MMP-1 억제활성물질 핵심구조의 해석이 가능한 수준의 정제와 HS68 cell을 이용한 *in vitro*계와 hairless mouse를 이용한 *in vivo*계에서의 활성 및 독성검토 등을 연구범위로 함.

(4) 석류로부터 소장 glucose uptake 저해활성물질의 분리, 정제, 구조규명, 소재화 등을 연구개발 내용으로 하며 구조규명 및 활성양식의 해석을 위한 순도 수준의 정제 등과 Caco cell을 이용한 *in vitro*계와 당뇨유발 mouse를 이용한 *in vivo*에서의 활성 확인, 독성 검토 등을 연구범위로 함.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

식·약용 생물자원들로부터 약리·생리활성 성분을 의약 및 식품용 중간원료의 소재로 실용화를 최종 목적으로 수행한 연구 개발 결과를 요약하면 다음과 같다.

-식·약용생물자원 160 여종을 극성별 계통으로 용매 추출 후 각각의 획분에 대하여 acetylcholinesterase (AChE) 저해 활성, choline acetyltransferase (ChAT) 활성, 항노화 활성, glucose uptake 저해 활성 (협동과제)을 검색한 결과 각각 유자, 대추, 두충, 석류가 선정되었다.

(1) 유자로부터 추출 분리한 AChE 저해 활성 물질은 naringenin 이었으며 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 한 결과 높은 AChE 저해 활성과 보호 작용을 보였으며 독성검사에서도 무독성을 나타내었다 (특허 출원 제 2003-27670).

(2) 대추로부터 ChAT 활성을 갖는 물질을 추출, 정제한 결과 oleamide 였으며, 동시에 *in vitro*와 *in vivo*에서 독성실험과 인지력, 기억력 실험을 한 결과 ChAT의 높은 활성과 보호작용을 보였으며 무독성을 나타내었다 (특허 출원 제 2003-27669).

(3) 두충으로부터 MMP-1 억제활성을 갖는 물질을 정제하고 구조의 규명과 함께 HS68 cell을 사용한 *in vitro*와 hairless mouse를 이용한 *in vivo* 실험을 실시한 결과 무독성의 MMP-1 억제활성이 높은 물질임을 확인하였다 (특허출원 10-2003-0028523).

(4) 석류로부터 추출, 분리한 glucose uptake 저해활성물질은 Caco cell을 사용한 *in vitro* 실험과 당뇨유발 mouse를 사용한 *in vivo* 실험에서 각각 높은 저해활성을 나타내었으며, 독성검사에서도 무독성을 나타내었다 (특허출원 10-2003-0028664).

## SUMMARY

Highly bio-reactive substances from natural plants were screened, purified and industrialized as functional foods.

The acetylcholinesterase inhibition of 160 Korean natural plants were compared for treating Alzheimer's disease (AD). The methanolic extracts from *Citrus junos* presented the highest inhibitory effect on acetylcholinesterase *in vitro*. The methanolic extract was further separated with hexane, chloroform, and ethyl acetate of water, in order. The ethylacetate solubles showed high inhibitory effect of acetylcholinesterase. In the process of isolation, each subfraction represented acetylcholinesterase inhibitory activity. From the first silica gel column chromatography, each subfraction showed high inhibitory effect against acetylcholinesterase when chloroform to methanol ratios were 80:20, 70:30. On the second silica gel column chromatography further separated with chloroform and methanol, it showed inhibitory activity against acetylcholinesterase when chloroform to methanol ratio was 86:14. This compound was purified by high performance liquid chromatography (HPLC). With this compound, we performed toxicity test. At the various concentrations, they were all survived. Values of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) have no significant differences by supplementation of *Citrus junos* methanolic extract in mice. We investigated the effect of *Citrus junos* on the scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in the Y-maze, an index of short-term memory in mice and passive avoidance test. Injection of control mice with scopolamine impaired performance on the Y-maze test (7% decrease in alternation behavior) and the passive avoidance test (25% decrease in step-through latency). In contrast, mice treated with *Citrus junos* methanol prior to scopolamine were protected from these changes. These results suggest that treatment with the methanolic extract of *Citrus junos* may prevent learning and memory deficits caused by scopolamine.

The choline acetyltransferase activation of 160 Korean natural plants were compared for treating AD. From screening results, the methanolic extract of

*Ziziphus jujuba* was selected as the most potent candidate containing choline acetyltransferase activation component. Methanol extracts of *Ziziphus jujuba* were separated into hexane, chloroform, ethyl acetate in turn. Chloroform fraction was selected from ChAT assay. From the first silica gel column chromatography, each subfraction exhibited high inhibitory effect against ChAT when chloroform to methanol ratios were 90:10, 80:20. On the second silica gel column chromatography further separated with chloroform and methanol, it showed inhibitory activity against ChAT when chloroform to methanol ratio was 90:10. It was purified by HPLC and identified by <sup>1</sup>H/ <sup>13</sup>C NMR and EI-MS. To investigate the effect of *Ziziphus jujuba* on the scopolamine-induced impairment learning and memory and acute toxicity in mice, *in vivo* test was performed. Mice were allowed free access to water containing methanol extract of *Ziziphus jujuba*. Injection of control mice with scopolamine impaired performance on the Y-maze test (16% decrease in alternation behavior) and the passive avoidance test (9% decrease in step-through latency). In contrast, mice treated with methanol extract of *Ziziphus jujuba* to scopolamine were protected from these changes. An acute toxicity experiment was undertaken to study the toxicity of methanol extract of *Ziziphus jujuba* on the activity of GOT and GPT in the blood serum of the mice. Values of GOT and GPT presented no significant differences. These results demonstrated that *Ziziphus jujuba* affected improvement of learning and memory ability against scopolamine *in vivo* and suggested that *Ziziphus jujuba* might be useful for the prevention of AD.

The aging process of skin can be attributed to intrinsic aging and photo-aging. Clinically, naturally aged skin showed smooth, pale, and finely wrinkled. In contrast, photo-aged skin presented coarsely wrinkled and associated with dyspigmentation, and telangiectasia. Photo-aging is influenced by several factors, including genetics, environmental exposure (ultraviolet irradiation, mechanical stress), hormonal changes, and metabolic processes (generation of reactive chemical compounds such as activated oxygen species). The influence of the environment, especially solar UVB irradiations have been demonstrated to produce reactive oxygen species (ROS) and which induces the synthesis of matrix metalloproteinases (MMP) which degrade extracellular matrix. We investigated expression of MMP-1 and MMP-2 in



human foreskin fibroblast HS-68 cell line under UVB irradiation using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for isolation and characterization of photoaging inhibitor, and screened the inhibitory activity of MMP-1 expression in twelve hundred extracts prepared by solvent extraction based on polarity from four hundred kinds of edible plants. Finally we found an appreciable high inhibitory activity in methanol fraction from *Eucommia ulmoides*. Cytotoxic effect was not shown in HS-68 cell line when we treated with isolated aucubin from *Eucommia ulmoides* according to concentration. Up until now, the most intensively studied dietary antioxidants for prevention of skin photodamage have been vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene. So we compared with vitamin C and vitamin E, isolated aucubin from *Eucommia ulmoides*.

Dietary carbohydrates are hydrolyzed and absorbed in the small intestine. Intestinal glucose uptake is mainly performed by the sodium-dependent glucose transporter, SGLT1. Therefore, inhibition of intestinal glucose uptake is beneficial in reducing the blood glucose level for diabetes and controlling weight gain in obesity. By using human intestinal epithelial Caco-2 cell, mice intestinal BBMV and novel fluorescent glucose analog, 2-NBDG, the author screened the inhibitory activities of intestinal glucose uptake in six hundred extracts prepared by solvent extraction based on polarity from the two hundred kinds of edible plants. In this study, existence of SGLT1 in the Caco-2 cell were detected by using enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), Western blot analysis and immunocytochemistry and regulation activity of SGLT1 protein was measured. In addition, inhibitory effects of extracts of *Punica granatum*, *Diospyros kaki*, *Raphanus sativus* and *Eucommia ulmoides* on intestinal glucose uptake streptozotocin-induced diabetic mice were measured. Particularly an appreciable high inhibitory effect was found in methanol extract of *Punica granatum*. PG-1a isolated from methanol extract of *Punica granatum* was tentatively determined as a phthalic acid-disononylester or hydroxyl alkyl ester with molecular weight of 418. The present results suggest that *Punica granatum* could play a role in controlling the dietary glucose absorption by inhibiting intestinal transporters as well as in reducing blood glucose level.

The bio-reactive compounds of selected samples, *Citrus junos*, *Ziziphus jujuba*, *Eucommia ulmoides* and *Punica granatum*, were isolated and purified with industrial-level procedure. Extracts of each samples were decolorized with low cost absorbents and purified by ultrafiltration using Milipore masterflex system. Finally, each purified bio-reactive compounds were formulated as the types of beverage, capsule and granule.

# CONTENTS

Summary (Korean) .....	2
Summary (English) .....	5
Contents (English) .....	9
Contents (Korean) .....	16
Part 1. The Outline for Research and Development .....	22
Chapter 1. The Purpose and Limit for Research and Development .....	22
Chapter 2. The Need of Research and Development .....	22
Part 2. The Present Condition of Technical development .....	26
Part 3. Results and research development .....	28
Chapter1. Practical Utilization of Acetylcholinesterase inhibitor from Micro-material .....	28
1. Introduction .....	28
2. Materials and Methods .....	29
A. Samples and Reagents .....	29
B. Experimental Approach .....	29
a. Sample preparation for screening of acetylcholinesterase inhibition substance .....	29
b. <i>In vitro</i> measurement of acetylcholinesterase inhibition .....	30
c. Purification and characterization of acetylcholinesterase inhibitor from <i>Citrus junos</i> .....	31
d. <i>In vivo</i> toxicity test of acetylcholinesterase inhibitor .....	32
e. <i>In vivo</i> ability of learning and memory test of acetylcholinesterase inhibitor .....	32

3. Results and Discussion .....	33
A. Screening of acetylcholinesterase inhibition substance from natural edible plants .....	33
a. Establishment of acetlycholinesterase assay for inhibitor screening from natural edible plants .....	33
b. Screening of acetylcholinesterase inhibitor .....	33
B. Toxicity of acetlycholinesterase inhibitor <i>in vivo</i> .....	39
C. Learning and memory test <i>in vivo</i> .....	40
a. Y-maze test .....	40
b. Passive avoidance test .....	41
D. Purification and characterization of acetylcholinesterase inhibitor .....	42
a. Separation of acetylcholinesterase inhibitor from <i>Citrus junos</i> .....	42
b. Search of effect of acetylcholinesterase inhibitor from <i>Citrus junos</i> in the first silica-gel column chromatography .....	43
c. Search of effect of acetylcholinesterase inhibitor from <i>Citrus junos</i> in the second silica-gel column chromatography .....	44
d. Separation of acetylchoinesterase inhibitor from <i>Citrus junos</i> .....	45
Chapter 2. Practical Utilization of Cholin acetyltransferase Activator from	
Micro-material .....	47
1. Introduction .....	47
2. Materials and Methods .....	48
A. Samples and Reagents .....	48
B. Experimental Approach .....	48
a. Sample preparation for screening of choline acetyltransferase activator .....	48
b. <i>In vitro</i> measurement of choline acetyltransferase activator .....	49
c. Purification and characterization of choline acetyltransferase activator from <i>Zizyphus jujuba</i> .....	50

c. Purification and characterization of choline acetyltransferase activator from <i>Zizyphus jujuba</i> .....	50
d. <i>In vivo</i> Toxicity test of choline acetyltransferase activator .....	51
e. <i>In vivo</i> ability of learning and Memory test of choline acetyltransferase activator .....	52
3. Results and Discussions .....	52
A. Screening of choline acetyltransferase activation substance from natural edible plants .....	52
a. Establishment of choline acetyltransferase assay for inhibitor screening from natural edible plants .....	52
b. Screening of cholin acetyltransferase activator .....	60
B. <i>In vivo</i> toxicity of choline acetyltransferase .....	60
C. <i>In vivo</i> learning and memory test .....	61
a. Y-maze test .....	61
b. Passive avoidance test .....	62
D. Purification and characterization of choline acetyltransferase activator .....	63
a. Separation of choline acetyltransferase activator from <i>Zizyphus jujuba</i> .....	63
b. Search of effect of choline acetyltransferase activator from <i>Zizyphus. jujuba</i> in silica-gel column chromatography .....	64
c. Separation of choline acetyltransferase activator from <i>Zizyphus. jujuba</i> .....	66
Chapter 3. Utilization of MMP-1 inhibitor from <i>Eucommia ulmoides</i> .....	67
1. Introduction .....	67
2. Materials and Methods .....	69
A. Samples and Reagents .....	69
B. Experimental Approach .....	71
a. Sample preparation .....	71
b. Determination of MMP-1 and MMP-2 inhibitory activities <i>in vitro</i> .....	71

c. Measurement of Cell viability .....	72
d. Preparation of <i>Eucommia ulmoides</i> .....	72
e. Measurement of Antioxidative effects .....	72
f. Acute toxicity of <i>Eucommia ulmoides in vivo</i> .....	72
g. Isolation and Purification of MMP-1 inhibitor from <i>Eucommia ulmoides</i> .....	73
3. Results and Discussions .....	74
A. Screening of MMP-1 inhibitor from edible plants .....	74
a. First screening of MMP-1 inhibitor from edible plants .....	74
b. Second screening of MMP-1 inhibitor from edible plants .....	74
c. Acute toxicity of <i>Eucommia ulmoides in vivo</i> .....	75
B. Isolation and Purification of MMP-1 inhibitor from <i>Eucommia ulmoides</i> .....	82
a. Extraction and separation of <i>Eucommia ulmoides</i> .....	82
b. Silica gel 60 open column chromatography .....	83
c. Prep-TLC .....	83
d. HPLC .....	84
e. Purification and characterization of MMP-1 inhibitor .....	84
C. Physiological property of aucubin from <i>Eucommia ulmoides</i> .....	88
a. Cytotoxicity of aucubin .....	88
b. Antioxidative effect of aucubin .....	88
c. Inhibitory activity of MMP-1 .....	89
d. Inhibitory activity of MMP-1 .....	89
Chapter 4. Utilization of intestinal glucose uptake inhibitor from <i>Punica granatum</i> .....	94
1. Introduction .....	94
2. Materials and Methods .....	96

A. Samples and Reagents .....	96
B. Experimental Approach .....	96
a. Sample preparation .....	96
b. Determination of intestinal glucose uptake and transport assay system .....	98
c. Acute toxicity of <i>Punica granatum in vivo</i> .....	98
d. Glucose uptake inhibitory activity of <i>Punica granatum in vivo</i> .....	98
e. Preparation of <i>Punica granatum</i> .....	101
f. Isolation and Purification of glucose uptake inhibitor from <i>Punica granatum</i> .....	102
g. Structure analysis of glucose uptake inhibitor from <i>Punica granatum</i> .....	102
3. Results and Discussion .....	102
A. Screening and selection of glucose uptake inhibitor from edible plants .....	102
a. First screening of glucose uptake inhibitor from edible plants .....	102
b. Second screening of glucose uptake inhibitor from edible plants .....	107
c. Glucose uptake inhibitory activity of <i>Punica granatum in vivo</i> .....	109
d. Acute toxicity of <i>Punica granatum in vivo</i> .....	112
B. Isolation and Purification of glucose uptaker inhibitor from <i>Punica granatum</i> .....	113
a. Extraction and separation of <i>Punica granatum</i> .....	113
b. First silica gel 60 open column chromatography .....	114
c. Second silica gel 60 open column chromatography .....	115
d. Prep- Thin layer chromatography .....	115
e. HPLC .....	115
C. Structure analysis of purified PG-1a .....	115
D. Glucose uptake inhibitory activity of PG-1a from <i>Punica granatum</i> ..	122
Chapter 5. Development of micro-material from natural edible plants as functional foods .....	123
1. Introduction .....	123

2. Optimization of extracting conditions in the industrial point .....	124
A. Extraction and purification procedures of acetylcholinesterase inhibitor from <i>Citrus junos</i> for industrial use .....	124
B. Extraction and purification procedures of choline acetyltransferase activator from <i>Zizyphus jujuba</i> for industrial use .....	127
C. Extraction and purification procedures of MMP-1 inhibitor from <i>Eucommia ulmoides</i> for industrial use .....	129
D. Extraction and purification procedures of glucose uptake from <i>Punica granatum</i> for industrial use .....	135
 Chapter 6. Development of bio-reactives from natural edible plants as the functional foods .....	141
 1. Materials and Methods .....	141
A. Production of beverage .....	141
B. Production of capsule .....	141
C. Production of granule .....	141
 2. Results .....	141
A. Production of beverage .....	141
B. Production of capsule .....	143
C. Production of granule .....	144
D. Appearance of end-product and contamination of microorganism .....	145
 Part 4. Achievements of purpose and rest of relative field .....	148
 Chapter 1. Purpose of research and development and achievement .....	148
 Chapter 2. The rest of relative field .....	153
 Part 5. Results of research and development and applicative plan .....	154



Part 7. References .....	157
APPENDIX .....	161
Publications .....	161
Patents .....	182

# 목 차

요약문 (한글) .....	2
요약문 (영어) .....	5
목 차 (영어) .....	9
목 차 (한글) .....	16
제 1장 연구 개발 과제 의 개요 .....	22
제 1절 연구 개발 과제 의 목적 과 범위 .....	22
제 2절 연구 개발 의 필요성 .....	22
제 2장 국내 · 외 기술 개발 의 현황 .....	26
제 3장 연구 개발 및 결과 .....	28
제 1절 뇌 기능 신경 전달 물질 분해 효소 저해 미량 소재 의 실용화 .....	28
1. 서 설 .....	28
2. 재 료 및 방 법 .....	29
가. 재 료 .....	29
나. 실험 방 법 .....	29
1) Acetylcholinesterase 저해 물질 의 검색 시료 제조 .....	29
2) Acetylcholinesterase 저해 효과 측정 .....	30
3) 유자 로 부터 의 acetylcholinesterase 저해 물질 의 정제 .....	31
4) Acetylcholinesterase 저해 물질 의 <i>in vivo</i> 상 의 독성 실험 .....	32
5) Acetylcholinesterase 저해 물질 의 <i>in vivo</i> 상 의 인지 능력 검사 .....	32
3. 결 과 .....	33
가. 식 · 약 용 식물 소재 로 부터 의 acetylcholinesterase 저해 활성 검색 .....	33
1) Acetylcholinesterase 저해 활성 성분 검색 assay 계 확립 .....	33

2) Acetylcholinesterase 저해 물질의 검색 .....	33
나. 선정된 acetylcholinesterase 저해 물질의 <i>in vivo</i> 상의 독성실험 .....	39
다. 선정된 acetylcholinesterase 저해 물질의 <i>in vivo</i> 상의 인지력 실험 .....	40
1) Y-maze test .....	40
2) Passive avoidance test .....	41
라. 선정된 acetylcholinesterase 저해 물질의 정제 .....	42
1) 유자에서의 저해 활성 물질의 탐색을 위한 1차 물질 분리 .....	42
2) First silical-gel column chromatography에 의한 유자 methanol 추출물의 AChE에 대한 억제 활성 .....	43
3) Second silical-gel column chromatography에 의한 유자 methanol 추출물의 AChE에 대한 억제 활성 .....	44
4) HPLC에 의한 유자 methanol 추출물의 저해 활성물질 분리 .....	45
제 2절 뇌기능 신경전달 물질 합성효소 활성화 미량소재의 실용화 .....	47
1. 서 설 .....	47
2. 재료 및 실험 방법 .....	48
가. 재 료 .....	48
나. 실험 방법 .....	48
1) Choline acetyltransferase 활성 물질의 검색시료 제조 .....	48
2) Choline acetyltransferase 활성 효과 측정 .....	49
3) 대추로부터의 choline acetyltransferase 활성 물질의 정제 .....	50
4) Choline acetyltransferase 활성 물질의 <i>in vivo</i> 상의 독성실험 .....	51
5) Choline acetyltransferase 활성 물질의 <i>in vivo</i> 상의 인지능력 검사 .....	52
3. 결 과 .....	52
가. 식·약용 생물자원으로부터의 choline acetyltransferase 활성 검색 .....	52
1) Choline acetyltransferase 활성 성분 검색 assay 계 확립 .....	52
2) Choline acetyltransferase 활성 물질의 검색 및 선정 .....	52
나. 선정된 choline acetyltransferase 활성 물질의 <i>in vivo</i> 상의 독성실험 .....	60
다. 선정된 choline acetyltransferase 활성 물질의 <i>in vivo</i> 상의 인지력 실험 .....	61
1) Y-maze test .....	61

2) Passive avoidance test .....	62
라. 선정된 choline acetyltransferase 활성 물질의 정제 .....	63
1) 대추에서의 저해 활성 물질의 탐색을 위한 1차 물질 분리 .....	63
2) Silical-gel column chromatography에 의한 대추 methanol 추출물의 ChAT 활성 .....	64
3) HPLC에 의한 대추 methanol 추출물의 활성물질 분리 .....	66
제 3절 외인성 피부노화 제어 미량 소재의 실용화 .....	67
1. 서 설 .....	67
2. 재료 및 방법 .....	69
가. 재 료 .....	69
나. 실험 방법 .....	71
1) MMP-1 억제 활성물질 검색용 시료의 제조 .....	71
2) MMP-1 및 MMP-2 억제 활성 assay 계 .....	71
3) Cell viability 측정 .....	72
4) 선정 시료 두층의 메탄올 추출 및 유기용매 분획 .....	72
5) 선정 시료의 항산화 활성 검토 .....	72
6) MMP-1 억제 활성 물질의 <i>in vivo</i> 독성 실험 .....	72
7) 두층으로부터 MMP-1 억제 활성 물질의 분리 및 구조 동정 .....	73
3. 결 과 .....	74
가. 식·약용 식물로부터 MMP-1 억제활성물질의 검색 .....	74
1) 식·약용 식물로부터 MMP-1 억제활성물질의 1차 검색 .....	74
2) MMP-1 억제 활성 물질의 2차 검색 .....	74
3) 선정된 두층 methanol 추출물의 <i>in vivo</i> 독성 실험 .....	75
나. 두층 함유 MMP-1 억제 활성 물질의 정제 및 구조 동정 .....	82
1) 두층의 methanol 추출 및 유기용매 분획 .....	82
2) Silica gel 60 open column chromatography .....	83
3) Prep-TLC .....	83
4) HPLC .....	84
5) 정제 물질의 구조 조정 .....	84

다. 두층으로부터 분리된 aucubindml 생리학적 특성 .....	88
1) Aucubin의 cytotoxicity .....	88
2) Aucubin의 항산화 활성 .....	88
3) MMP-1의 억제 활성 .....	89
4) MMP-2의 억제 활성 .....	89
제 4절 비만, 당뇨 예방용 glucose uptake 조절 미량 소재의 실용화 .....	94
1. 서 설 .....	94
2. 재료 및 방법 .....	96
가. 재 료 .....	96
나. 방법 .....	96
1) Glucose uptake 저해 활성 물질의 검색 시료의 조제 .....	96
2) Glucose uptake 저해 활성 assay 계 .....	98
3) Glucose uptake 저해 활성 물질의 <i>in vivo</i> 독성 실험 .....	98
4) <i>In vivo</i> 에서의 glucose uptake 저해 활성 .....	98
5) 선정시료 석류의 methanol 추출 및 유기용매 분획 .....	101
6) 석류로부터 glucose uptake 저해 활성물질의 분리 및 정제 .....	102
7) 석류 함유 glucose uptake 저해 활성 물질의 구조 분석 .....	102
3. 결 과 .....	102
가. 식·약용 식물로부터의 glucose uptake 저해활성물질의 검색 .....	102
1) 식·약용 식물로부터 glucose uptake 저해활성물질의 1차 검색 .....	102
2) Glucose uptake 저해 활성 시료의 2차 검색 .....	107
3) <i>In vivo</i> 에서의 glucose uptake 저해 활성 .....	109
4) 선정된 석류 methanol 추출물의 <i>in vivo</i> 급성 독성 .....	112
나. 석류함유 glucose uptake 저해 활성물질의 정제 .....	113
1) 석류의 methanol 추출 및 유기 용매 분획 .....	113
2) 1차 silica gel 60 open column chromatography .....	114
3) 2차 silica gel 60 open column chromatography .....	115
4) Prep-Thin layer chromatography .....	115

5) HPLC .....	115
다. 정제 물질 PG-1의 구조 해석 .....	115
라. 석류로부터 분리된 PG-1a의 glucose uptake 저해 활성 .....	122
제 5절 식·약용 생물 자원 함유 미량 소재의 실용화 .....	123
1. 서 설 .....	123
2. 선정 시료들로부터 생리 활성 물질 추출 조건의 최적화 및 공업적 수준 의 정제 방법 확립 .....	124
가. 유자로부터 acetylcholinesterase inhibitor 물질의 공업적 추출 및 정제 .....	124
나. 대추로부터 choline acetyltransferase 활성 물질의 공업적 추출 및 정제 .....	127
다. 두충으로부터 MMP-1 억제활성성분의 추출 및 공업적 추출 및 정제 .....	129
라. 석류로부터 glucose uptake 저해 활성 물질의 공업적 추출 및 정제 .....	135
제 6절 식·약용 함유 생리활성 물질의 기능성 식품화 .....	141
1. 재료 및 방법 .....	141
가. 드링크제 제작 .....	141
나. 연질 캡슐 제작 .....	141
다. 과립제 제작 .....	141
2. 결 과 .....	141
가. 드링크제 제작 .....	141
나. 연질 캡슐 제작 .....	143
다. 과립제 제작 .....	144
라. 제품의 외관 및 안정성 검사 .....	145
제 4장 목표달성도 및 관련분야 기여도 .....	148
제 1절 연구개발 목표 및 달성도 .....	148

제 2절 관련분야에의 기여도 .....	153
제 5장 연구개발 결과 활용계획 .....	154
제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보 .....	155
제 7장 참고 문헌 .....	157
부록 .....	161
학회 발표 및 논문 발표 .....	161
특허 출원 .....	182

## 제 1장 연구 개발 과제의 개요

### 제 1절 연구 개발 과제의 목적과 범위

최근 국민생활 수준의 향상과 더불어 의학기술이 고도로 발달함에 따라 노인의 인구가 증가되어 인구의 고령화 현상이 두드러지게 나타나고 있다. 우리나라의 경우 평균 수명(1998년 현재 74세)의 연장 및 출산율 저하로 인해 전체 인구에서 고령화 인구가 차지하는 비율이 증가되어 1955년에는 전체인구 중 65세 이상의 노인인구가 3.7%이었으나, 2000년 6.8%, 2030년 14.0%로 예상되고 있으며 미국의 경우도 1900년의 4.7%가 1986년 11%로, 2000년 15%이상으로 예상되고 있다. 이러한 고령화 현상과 함께 국제경쟁력을 확보하기 위한 조직사회의 구성원들간의 치열한 경쟁에 의해 이로 인한 성인병의 발병률이 급격한 증가 추세를 보이고 있다. 사망원인 또한 감염형 질환의 비율은 감소한 반면 대표적인 성인병인 순환기계 질환, 암, 간장질환에 의한 사망비율이 전체의 절반을 넘기기에 이르렀다. 이에 따라 건강하게 장수하고자 하는 욕구가 커지면서 현대의료 기술에 대한 불안감을 갖게 됨과 동시에 일상생활을 통한 예방에 관심이 높아질 것으로 예견되고 있다.

본 연구그룹이 선정한 식·약용류(양념채소류 및 전통차·죽류)는 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 많았던 작물로서 과거 빈번한 수요·공급의 불균형으로 농산물 가격의 등락과 생산 농민의 영농의욕을 떨어뜨려 경제적, 사회적 문제로 대두되기도 하였다. 식·약용류의 가격 안정을 통한 생산량 증대와 경쟁력을 갖는 하나의 산업으로 육성하기 위해서는 이들로부터 고부가가치성 물질의 개발과 제품화가 전제되어야 한다. 뿐만 아니라 WTO 체제의 출범으로 인한 시장개방 하에서 국내 농·임업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 식용 농·임산자원을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 따라서 본 연구는 국내산 식·약용 생물자원(양념채소류, 전통차 및 죽류)을 대상으로 고령화병과 성인병의 대표적 질환인 노인성 치매, 피부노화, 비만, 당뇨의 예방 또는 치료에 이용될 수 있는 미량성분을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 제품을 실용화함으로써 국내 농림산업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 한다.

### 제 2절 연구 개발의 필요성

제 1 세부과제에서는 식·약용 생물자원으로부터 뇌기능 신경전달물질 분해효소를 저해하는 미량소재를 검색하고 이를 실용화시키고자 한다. Alzheimer's



disease(AD, 노인성 치매)는 진행성 치매의 일종으로 비가역적 행동과 인성의 변화, 사고능력의 저하로 나타나며 현재 정확한 원인과 치료법은 밝혀지지 않았다. AD의 경우 신경전달물질을 통한 신경세포간의 정보교환과정이 파괴됨에 따라 신경세포의 기능이 정지되고 신경세포간의 연결이 끊어짐으로써 결과적으로 신경세포가 죽게 된다. AD는 중추신경, 특히 전뇌(forebrain), 소뇌편도(amygdala), 해마(hippocampus) 및 대뇌피질 같은 피질과 변연계 (limbic system)의 신경을 파괴하는데 이들은 뇌에서 학습, 기억, 사고, 행동, 감정조절 등과 관련된 부위이다. 특히 AD에서 acetylcholine과 같은 신경전달물질의 고갈이 가장 중요한 현상이며 이것을 회복시키는 것이 AD 치료 목표의 하나가 된다. 부교감 신경성 약물은 muscarinic 또는 nicotinic agonist, cholinesterase inhibitors (ChEIs), 간접적으로 acetylcholine 유리를 조절하는 약물들로 나눌 수 있다. ChEIs는 많은 약물들이 개발되고 있는데 제1세대 ChEIs (tacrine, physostigmine, 서방형 physostigmine)와 제2세대 ChEIs (donepezil, ENA 713, metrifonate, galanthamine, eptastigmine)로 나누어진다. 제2세대 ChEIs는 제1세대 ChEIs에 비해 작용시간이 길고 약동학적으로 안정되어 있으며 뇌혈관 관문 통과율이 높아서 중추신경 내 농도가 높은 경향이 있다. 제1세대 ChEIs는 acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, 다른 말초 cholinesterase를 비선택적으로 억제하는 반면, 몇몇 새로운 ChEIs는 acetylcholinesterase에 대한 선택성이 높아 말초부작용의 발생이 감소한다고 한다. ChEIs의 작용기전은 acetylcholine의 분해를 억제함으로써 synapse 내의 acetylcholine 농도를 증가시키는 것에 기인하는 것으로 알려져 왔으나, 최근의 연구결과에 따르면 ChEIs가 신경보호작용(neuroprotective effect)이 있고 장기간 acetylcholinesterase를 억제했을 때는 정상적인 amyloid precursor protein 분해과정을 촉진시킴으로써 beta-amyloid 생성을 억제한다는 보고도 있다.

제 2 세부과제에서는 뇌기능 신경전달물질 합성효소를 활성화시키는 미량소재를 식·약용 생물자원에서부터 분리하고 이를 실용화시키고자 한다. ChEIs는 뇌에서 신호전달을 원활하게 해주는 신경전달 물질인 acetylcholine을 보호하는 기능을 갖지만 이와는 달리 직접적으로 acetylcholine의 생성을 활성화시켜주는 인자가 choline acetyltransferase (ChAT)로 알려져 있다. 뇌의 전두엽 (basal forebrain)은 cholinergic neuron을 상당수 포함하고 있고, 이 부위에 있는 cholinergic neuron이 인지능력을 관장하고 있는 것으로 보인다. 노인성 치매환자에 있어서 ChAT의 양은 급격히 감소되는 것을 볼 수 있고, ChAT의 활성도 감소되어 acetylcholine의 농도가 낮아진다. ChAT는 신경의 pre-synaptic 부분에서 choline과 acetyl-CoA로부터 acetylcholine을 생성하는 효소로 활성을 증진시켜주기 위해 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF)나 신경영양물질

(neurotrophin)을 투여하기 위한 연구도 진행 중이지만, 이는 drug delivery에서 문제점을 갖고 있다. 인간의 두뇌는 강력한 뇌막 (blood brain-barrier)으로 보호를 받고 있고, 이 막은 특정물질에 대한 선택성을 보이기 때문에 생리적으로 단백질과 지방과 같은 큰 분자량을 갖는 물질의 투과가 쉽지 않다. ChEIs와는 달리, 환자의 인지능을 향상시켜 주기 위한 ChAT activator로 보고된 FDA 승인 약품은 아직 없으나 최근 일본 Kitasato 연구소에서 한약재로부터 NGF-like factor를 찾아냈고, 이 물질이 ChAT 활성을 증진시킨다는 보고가 있었다. 현재까지의 치매의 치료는 증상완화 또는 질병의 진행속도를 늦추는 것에 지나지 않고 질병자체를 치료하지는 못하고 있다. 노인성 치매는 대부분 65세 이상의 고령인구에서 발병하고 고령인구의 증가 추세에 따라 향후 노인성 치매환자를 돌보는 보호자들의 고통과 치료비용을 포함한 경제적인 손실까지 고려한다면 노인성 치매는 점차 공중보건문제에 있어 더욱 중요한 위치를 차지하게 될 것이다.

제 3 세부과제에서는 태양광 중 UVB에 의한 피부노화를 제어할 수 있는 미량성분을 식·약용 생물자원으로부터 검색하고 이를 소재로 실용화시키고자 한다. 피부는 신체기관 중 가장 큰 부위를 차지하며, 주변 환경에 대응하여 보호, 체온 조절, 배설, 면역기능 등 다양한 역할을 수행하고 있다. 광노화로 인해 피부는 깊은 주름, 색소침착, 거칠음, 탄력저하 등과 같은 변화가 진피층의 구조 및 조성의 변화와 함께 나타나게 된다. 태양광으로부터 발생하는 UV(ultraviolet radiation)는 피부세포 특히, 표피와 진피세포의 DNA와 피부 진피층의 90%를 차지하는 collagen 단백질을 손상시키는 것으로 밝혀져 있다. DNA의 손상은 피부암을 유발시키는 요인으로 추측되고 있으며, collagen 단백질의 붕괴는 피부의 탄력과 강도를 감소시켜 피부노화를 일으키는 광노화(photoaging)의 주기작으로 알려져 있다. 고령화 인구가 증가하면서 피부에 대한 관심도 점차 증대되고 있으나 국내의 경우 의과, 약학대학에서 주로 염증과 피부 창상에 대한 상처 치료분야를 연구하고 있을 뿐 광노화의 기전과 항피부노화 생리활성물질에 대한 연구는 극히 미미한 실정에 있다. 뿐만 아니라 피부노화 연구는 실험재료의 채취하기가 쉽고 시료채취 후에도 계속적으로 노화현상에 대한 연구를 수행할 수 있어 향후 인체 노화연구의 대표적 model이 될 가능성이 높다.

제 4 세부과제 (협동 과제)에서는 성인병 질환의 주원인으로 지적되고 있는 비만과 대표적 성인병의 하나인 당뇨를 예방함에 있어 장관 내에서 glucose의 흡수를 조절할 수 있는 미량소재를 식·약용 생물자원으로부터 분리하고 이를 실용화시키고자 한다. 현대 의학의 발달에 따라 평균 수명이 증가하고 사망 원인도 인구의 노령화, 운동 부족, 잘못된 식습관 등과 밀접한 관련을 가지고 변화하고 있다. 최근 10년 동안의 사망 원인 중 당뇨병 사망률이 2.5배 증가하고 동맥 경화, 뇌졸중 등 특히 비만에 의한 사망이 크게 증가하고 있다. 비만이 반드시 이

들 성인병의 직접적인 원인이라고 말할 수는 없으나 당뇨를 예로 들 경우 비만 해지면 간에서 당 생산의 증가, 말초 기관에서 인슐린 효과의 저하와 함께 많은 식사량에 따른 혈당의 상승 등 그 촉매 역할을 한다는 점은 의심할 바가 없다. 탄수화물의 흡수 형태 중의 하나인 glucose는 혈중으로 흡수되어 각 기관에서 빠르게 이용된다는 면에서 영양학적으로 가장 중요한 단당류라고 할 수 있다. 탄수화물은 입과 장내에서 소화되어 장의 mucosal cell에서 흡수되며 흡수 시 에너지, special receptor 및 glucose transport protein인 GLUT와 SLUT가 관련한다. 현재까지 glucose transport는 흔히 비정상적인 비만과 비인슐린 의존 당뇨 mellitus type 2 (NIDDM)에 관여하는 것으로 보고되어 있다. 이들 중 GLUT은 glucose의 흡수 연구와 insulin action에 연관되어 있고 특히 GLUT1과 3은 basal에 존재하여 glucose의 uptake에 관계한다. 이들 transporter를 저해하는 물질에 대한 연구가 flavonoid계 물질을 중심으로 진행되고 있으나 저해효과만을 확인하였을 뿐 저해 기작은 아직 밝혀지지 않은 상태이다. 최근 flavonoid류 quercetin의 glucose uptake 저해효과가 밝혀지면서 식·약용 생물자원에도 저해활성 성분이 함유되어 있을 것으로 예상되며, 이 성분들을 소재화하여 장에서의 glucose 흡수를 낮출 수 있다면 비만에 의해 촉매되는 당뇨 등 성인병에 있어 다이어트의 스트레스를 덜어 줄 수 있는 최선의 방안이라 하겠다.

## 제 2장 국내외 · 기술 개발 현황

현재까지 보고된 항치매 활성화 성분은 주로 식물기원성 저분자로 특히 노인성 치매 환자들에게 인지적 증상을 호전시키는 약물로서 ChEIs를 많이 사용되고 있다. 제1세대 ChEIs로서 최초로 항치매 작용에 있어 적용 승인을 받은 tacrine은 작용지속 기간이 짧아 하루 4번 투여해야 하며, 간 독성이 있어 monitoring의 번거로움이 있다. 요즈음 주목받고 있는 제2세대 ChEIs들로는 일본에서 개발되어 96년말 미국 FDA 승인을 받고 97년부터 세계 30여국에서 판매되고 있는 donepezil로 하루 한번 복용할 수 있고, 선택적인 저해로 말초 부작용을 줄였다. Rivastigmine은 미국 노바티스사에서 개발한 약물로, 스위스에서 1997년 12월에 승인 받아 EU와 남아메리카 국가들에서 사용되고 있고, 미국, 캐나다에서도 승인 준비중이며, 우리나라에는 97년 9월 도입되었다. Rivastigmine은 하루 2번 복용이 가능하고 중추신경계에 특이성이 높아 말초 부작용을 크게 감소시켰고 신장에서 대사되므로 간 독성이 거의 없는 것으로 보고되고 있다. Metrifonate가 치매환자에 3상 임상실험이 진행중이며, 비가역적인 AChEIs로서 작용기간이 길다. 또 하나의 항치매 활성화 성분으로 ChAT activator가 있지만 ChEIs처럼 많은 물질들이 개발되어 있지는 않고 현재 FDA 승인 약품은 없다. 일본에는 한약재에서의 ChAT activator가, 우리나라의 경우 원광대 한의대에서 개발된 '치매단'이 있을 뿐 국내 항치매 성분의 연구는 아직 체계적으로 진행되지 않고 있는 실정이다. 현재 노인성 치매에 있어 완전한 치료는 불가능하지만 초기-중기의 치매환자에서 인지적, 비인지적 증상을 개선하기 위한 노력은 계속되고 있다.

피부 광노화에 대한 기전은 국내외적으로 아직 규명된 바 없으며 현재는 미시건 대학의 Gary J. Fisher의 학설이 가장 주목을 받고 있다. 이 설은 UV에 의해 자극된 피부의 각질세포나 섬유아세포 표면의 growth factor 및 cytokine receptor가 여러 단계의 protein kinase cascade를 통한 signal transduction 과정을 거치면서 세포핵에 위치한 transcription factor인 AP-1을 자극, MMP (matrix metalloproteinase)의 전사를 촉진시킴으로써 최종적으로 진피층의 collagen과 다른 구성요소들이 붕괴되어 노화를 일으킨다는 이론이다. UV는 활성산소의 형성도 함께 유도하며 형성된 활성산소종은 다시 광노화의 기전과도 밀접하게 관련되어 있음이 보고되어 있다. 독일 Dr. Fusenig에 의한 HaCaT cell line (피부표피세포)의 개발 이후 이 세포주를 이용한 피부의 연구가 signal transduction, MMP (matrix metalloproteinase), 활성산소종 등에 초점을 맞춰 활발히 진행 중에 있다. 국내의 경우는 retinoic acid를 비롯해 주름형성을 막거나 개선시켜주는 물질에 대한 연구가 몇몇 화장품업체 및 소수의 대학에서 진행 중에 있으나 광노화 기전 및 광노화로부터 피부 보호물질 또는 광노화 억제물질에

대한 연구는 거의 진행되고 있지 않은 실정이다.

Glucose uptake에 관한 연구는 주로 GLUT, SLUT 등의 glucose transporter 중심으로 이루어져 왔고, 비만, 당뇨 관련 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. Ellwood 등은 Caco-2 cell을 통한 단당류의 흡수와 이용을 연구했고, Bissonnette 등은 세 가지 단당류의 흡수와 glucose transporter의 관계를 역시 Caco-2 cell에서 관찰하였다. Caco-2 cell line은 인간의 대장암 세포로부터 분리, 개발시킨 cell line으로 연속된 분화상태와 형태가 소장의 소화·흡수 시스템을 잘 나타내고 있어 미네랄을 비롯한 영양물질의 uptake나 transport의 기전을 표현할 수 있는 모델로 널리 사용되어 왔다. 최근 flavonoid의 glucose uptake의 저해효과가 U937 cell에서 밝혀진 바 있으며, 천연물 소재와 glucose 관련 연구로는 Onomura 등의 ginseng radix에 의한 glucose의 흡수 저해가 있다. 그 밖에 Stumpel 등에 의해 장에서의 glucose uptake와 간 관련 연구도 보고되어 있으나 주로 기전적인 연구들로 실용적인 측면에서의 연구개발이 요구되고 있다.

## 제 3장 연구 내용 및 결과

### 제 1절 뇌기능 신경전달물질 분해효소 저해 미량소재의 실용화의 내용 및 결과

#### 1. 서 설

산업과 의료기술이 발전함에 따라 치매환자는 급격히 늘어나고 있으며, 우리나라에서도 계속 환자가 증가하고 있다. 치매 환자의 비율은 연령에 따라 변하는데 85세 이상은 약 30% 정도가 환자인 것으로 나타나고 있다. 치매 (Dementia)는 점진적인 기억력 장애가 실어증 (aphasia), 실인증 (인식불능; agnosia), 실행증 (apraxia) 등의 행동적인 장애와 함께 나타나 사회 직업적 기능의 장애를 가져오는 것을 말한다. 이런 치매에는 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 혈관성 치매 (vascular dementia), 중독성 치매 등이 있으며 이 중에서 AD는 50% 이상을 차지하고 있고 여성이 남성에 비해서 2-3 배 정도 더 발병하는 것으로 알려져 있다.

AD는 점진적인 퇴행성 질환으로서 기억력장애를 비롯한 인지장애를 핵심증상으로 하고 있다. 발병 초기에는 단기 기억의 감소현상이 나타나고 6-20년 동안은 계속적으로 기억력, 합리성, 판단력의 저하가 진행되며 보통 10년 이상이 되면 사망한다. 특히 사후 부검에 의해서 기억과 감정, 행동 등을 담당하는 변연기관 (Limbic-system)인 대뇌피질 (cerebral cortex), 해마체 (Hippocampus) 등에 신경반 (Senile plaques; SPs = neuritic plaques; NPs)과 신경섬유다발 (Neurofibrillary tangles; NFTs)이 관찰되며 이것은 AD를 판별할 수 있는 근거가 되기도 한다.

아세틸콜린은 AD에서 일관성 있게 감소되어 있으며 이것이 뇌의 기능 부전 특히 기억 장애를 일으킨다. AD에서는 특히 측두엽에서 아세틸콜린을 합성하는데 중요한 choline acetyltransferase가 감소되어있어, 이러한 관찰들은 AD가 아세틸콜린이라는 신경 전달 물질의 장애에 기인한다는 가설을 뒷받침한다. AD 치료에 있어 acetylcholine을 분해하는 효소인 acetylcholinesterase (AChE)를 억제해 ACh 농도를 증가시키는 방법이 있다. 실제로 physostigmine, neostigmine 등의 AChE 억제제들이 임상실험에 사용되었으며 최근 tetrahydroaminoacridine (THA, tacrine)이 주성분인 Cognex가 FDA에서 치매 치료제로 허가되어 시판되고 있다. 이러한 연구 중에서 아직까지는 acetylcholinesterase (AChE)의 저해제를 찾아 아세틸콜린의 분해를 억제시킴으로써 치매를 개선시키려는 노력이 경주되고 있다.

본 연구에 사용한 유자 (*Citrus junos*)는 분류학상으로 운향과 (云香科), 감귤속에 속하는 과실로서 주요성분은 Organic acid, Vitamin C, Limonoid, Hesperidin 등이 있으며 노화와 피로 방지에 효과가 있는 각종 유기산이 다량 함유되어 있고 그밖에 비타민 C, B, 당질, 단백질 등이 다른 감귤류 과실보다 많다. 한방적 가치를 인정받아 생약으로의 이용이 많으며 민간요법으로도 감기예방을 위한 비타민 C 공급원으로 널리 알려져 있다. 유자는 세계적으로 우리나라와 중국, 그리고 일본에서만 생산된다. 국내 주요 유자 산지로는 전남 고흥, 완도, 장흥, 진도, 경남 거제, 남해, 통영 등이 있다. 유자의 이용현황은 일반적으로 미숙과, 성숙과로 구별하여 이용되며 미숙과는 청유자 (靑柚子)로서 약용으로, 성숙과는 10월 하순부터 일부를 착즙하여 주스용이나 식초용으로, 과피는 과자류의 첨가물 및 차류로 판매되고 있다.

본 연구에서는 160여종의 식·약용 생물자원의 추출물에 대하여 acetylcholinesterase(AChE) 저해 활성의 검색과정에서 가장 높은 저해율을 보인 유자 (*Citrus junos*)의 methanol 추출물로부터 저해 물질을 분리하여 그것의 AChE 저해 효과와 인지력 향상 효과를 조사하고 아울러 그 구조적 특징을 조사하여 산업화 하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 재료

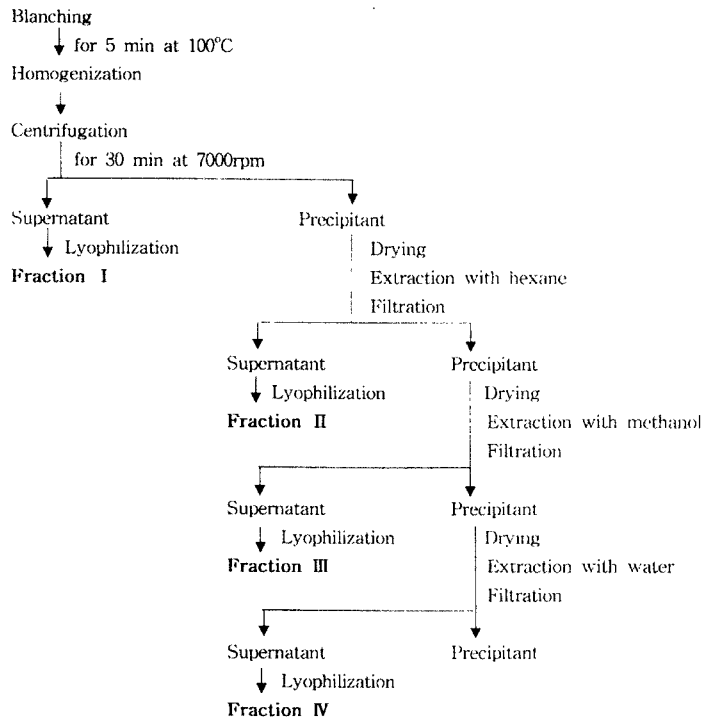
본 실험에 사용한 시료들은 서울 경동시장에서 직접 구입하였다. Actylcholinesterase 저해 측정 시약으로 Acetylthiocholine Iodide와 DTNB (5'5-Dithio-bis(2-benzoic acid))는 Sigma 제품을 사용하였으며, cell culture를 위하여 RPMI-1640 medium과 FBS (fetal bovine serum), horse serum 은 Gibco 사 제품을 사용하였다. 시료의 분석을 위해 Analytical HPLC column은  $\mu$ -bondapack C<sub>18</sub> revers phase (3.9 × 300mm)를 Waters에서 구입하여 사용하였다. 또한 인지능력 실험을 위해 ICR mouse를 샘타코에서 분양받아 사용하였다. 그 밖의 분석에 사용한 시약은 모두 특급 수준의 시약을 사용하였다.

### 나. 실험 방법

#### 1) Acetylcholinesterase 저해 물질의 검색시료 제조

160여종의 식·약용 생물자원을 Scheme 3-1-1 에서 표시한 것처럼 계통추출하였다. 구입한 시료를 파쇄한 재료와 파쇄하지 않은 재료로 구분하여 위의 추출 방법에 따라 100℃에서 5분간 끓여서 효소 활성을 실험시키고 분쇄한 후 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상등액을 동결건조 하여 Fr. I의 시료를 조제하

였다. 침전물은 건조시킨 후 연속적으로 hexan, methanol, ethylacetate 순으로 환류추출 한 뒤 각각의 상등액을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III, IV을 얻었다.



**Scheme 3-1-1. Systemic extraction method from edible plant sources for food and drug.**

## 2) Acetylcholinesterase 저해 효과 측정

### 가) 효소 제조

PC12 cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 세포 수가  $10^7$ - $10^8$  cell/ml가 되었을 때 cell lysis buffer를 이용하여 세포로부터 acetylcholinesterase (AChE)를 조제한다. Enzyme의 농도는 Bradford 법을 이용하여 측정한다.

### 나) Acetylcholinesterase 저해 측정

10,000 x g에서 원심분리하여 얻은 AChE 10  $\mu$ l(15 mg/ml)과 기질용액 (500  $\mu$ M acetylthiocholine, 1mM 5,5'- dithio-bis(2-nitrobenzoic acid, DTNB)의 혼합 용액)70  $\mu$ l, 식물시료 추출액 10  $\mu$ l(300  $\mu$ g/ml), 50 mM



Sodium phosphate buffer(pH 8.0) 50  $\mu$ l를 96 well plate의 각 well에 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 ELISA reader로 흡광도(405 nm)에서 측정하여 추출획분의 AChE 저해활성을 측정하였다.

\*저해 활성도(%)

$$= \{1 - (\text{시료 실험군} - \text{시료 대조군}) / (\text{효소 반응군} - \text{효소 대조군})\} \times 100$$

### 3) 유자로부터의 acetylcholinesterase 저해제의 정제

가) Acetylcholinesterase 활성 저해 물질의 분리

선정된 유자 (*Citrus junos*)를 hand mixer로 곱게 마쇄한 후 10 kg의 유자 조말을 methanol 5배 부피로 4 $^{\circ}$ C에서 2주 동안 정치시키면서 2회 추출한 후 감압농축하여 유자 methanol 추출물을 조제하다. 추출물로부터 methanol을 완전히 제거한 후 hexane, chloroform, ethyl acetate를 각각 5배 부피로 환류 추출하여 1차적인 물질 분리를 실시하였다. 추출된 crude methanolic extract는 극성도에 따라 solvent partitioning을 실시하여 저해 활성을 확인하였다. 저해 활성이 높게 나온 부분을 가지고 open silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>:MeOH)을 시행하여 11개의 소분획 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)으로 분획 하였다. 각각의 분획을 AChE 저해 활성을 측정하여 그 중 저해 활성이 높은 획분을 선정하여 2차 open silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>:MeOH)시행하여 13개의 획분(CHCl<sub>3</sub>:MeOH= 100:0, 90:10, 86:14, 82:18, 80:20, 78:22, 76:24, 74:26, 72:28, 70:30, 66:34, 62:38, 0:100)으로 나누고 그중 저해활성이 가장 높은 획분을 분리하였다.

나) HPLC에 의한 유자(*Citrus junos*)의 acetylcholinesterase 저해 물질 분리

Waters 2690 HPLC와 Waters  $\mu$ -bondapack C<sub>18</sub> revers phase (3.9  $\times$  300mm) column을 사용하였다. 0-100%의 methanol과 물의 직선농도 구배로 변화를 주어 80분간 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate은 분당 1.0 ml로 하였으며 한번에 20  $\mu$ l씩 시료 주입을 하였다. 사용 용매는 특급 methanol과 3차 증류수를 사용하였다 (Table 3-1-1).

**Table 3-1-1. Condition of the analytical HPLC for purification of AChE inhibitor from *Citrus junos*.**

Instrument	Waters 2690
Detector	Waters 996 (at 235 nm)
Column	$\mu$ - bondapak C <sub>18</sub> (reverse phase, 3.9×300 mm)
Flow rate	1 ml/min
Mobile phase	0%~100% Methanol (gradient elution)
Injection volume	0.02 ml

다) 정제물질의 NMR 및 EI mass 분석

정제된 물질 (4 mg)을 <sup>1</sup>H-NMR (600MHz)과 <sup>13</sup>C-NMR (MHz) (Brucker German, Advace-600)를 이용하여 측정하였으며, 정제된 물질 (1mg)을 Electronic ionization (EI) mass (JEOL, JMS-AX505WA)를 이용하여 그 구조와 mass size를 측정하였다.

#### 4) Acetylcholinesterase 저해 물질의 *in vivo*상의 독성실험

실험동물로 ICR mouse(5주령)를 사용하여 2일간 적응시킨 후 조식료를 0, 100, 500, 1500 mg/kg의 sample은 각 group당 준비된 10마리의 mouse에 매일 오전에 경구투여를 하였고 mouse는 20-24℃, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photoperiod chamber에서 food and water를 *ad lib.* 의 상태로 공급하였다. 독성 여부를 보기 위해 몸무게의 변화와 간독성을 측정하였다.

가) 급성 독성과 몸무게의 변화

급성독성을 보기의해 생존율(%)과 몸무게의 변화를 보았다.

나) GOT (glutamic oxaloacete transaminase) 및 GPT (glutamate pyruvate transaminase) 활성도

간 독성을 보기위해 GOT, GPT kit을 이용하여 혈청에서 검사하였다. 각각의 기질을 1 ml 씩 시험관에 넣고 37℃ 수조에서 가온한 후 혈청 0.2 ml씩 넣은 후 GOT의 경우 60 분, GPT의 경우 30 분간 반응시킨 다음 발색액 2,4-dinitrophenylhydrazine을 1.0 ml 씩 넣고 실온에서 20 분간 반응시킨 후 0.4 N-NaOH을 10.0 ml씩 넣어 반응을 중지 시켰다. 반응 중지 30 분 후에 505 nm 에서 측정하고 여기서 얻은 검량 곡선을 이용하여 효소의 활성단위로 환산하였다.

#### 5) Acetylcholinesterase 저해 물질의 *in vivo*상의 인지능력 검사

*In vivo* behavioral test를 위한 sample은 3가지의 농도(0.003, 0.006, 0.009%)로

준비하였다. ICR-mouse는 정상군, 대조군, 각 농도에 따른 실험군으로 하여 5group으로 나누고 각 group당 10마리씩 배분하였다. 정상군과 대조군은 일반 식이와 물을 주었고 실험군들은 각각의 농도 (0.003, 0.006, 0.009%)로 시료를 투여하였다. Mouse는 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photo-period chamber에서 모든 식이와 물은 *ad lib.*로 공급하였다.

#### 가) Y-maze test

치매 유발 물질로 Scopolamine (1.0 mg/kg) 100  $\mu$ l을 대조군과 실험군에 주사하여 일시적인 memory impairment를 유도 한 다음 30 분 후 실험을 실시한다. 정상군은 scopolamine 대신에 sodium chloride 0.85% (W/V)를 주사하였다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms을 기록했다. Mouse를 arm에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.

#### 나) Passive avoidance test

모든 mice를 실험 전날 실험 상자에서 적응 훈련(명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험한다. 실험 당일 Scopolamine (1.0 mg/kg) 100  $\mu$ l을 복강 주사하여 memory impairment를 유도한 다음 30 분 후 test를 실시하여 암실로 들어가는 시간 (Step through latency)을 측정한다. 대조군은 정상 사육한 다음, 시험당일 sodium chloride 0.85% (w/v)을 주사한다.

### 3. 결 과

#### 가. 식·약용 생물자원으로부터의 acetylcholinesterase 저해활성 검색

##### 1) Acetylcholinesterase 제어 활성성분의 assay 계 확립

치매에 있어서 주원인으로 보고되어 있는 acetylcholinesterase에 의한 뇌신경 전달 물질(acetylcholine)의 분해를 억제 또는 저해하는 물질의 assay계를 PC12 cell line을 이용하여 Fig 3-1-1 같이 확립했다.

##### 2) Acetylcholinesterase 저해물질의 검색 및 선정

160여종의 식·약용 생물자원으로 부터의 acetylcholinesterase 저해활성을 본 assay 계에 적용냉수 추출 획분 (Fr. I), hexane 추출 획분 (Fr. II), methanol 추출 획분 (Fr. III) 및 열수 추출 획분(Fr. IV)을 대상으로 검색한 결과 셀러리 (seed) (*Apium graveolens L.*) methanol 추출물, 옥수수차 (*Zea mays*) methanol 추출물, 유자 (*Citrus junos*) methanol 추출물에서 각각 52.38, 42, 53%의 활성을

보였다. 1차 활성검색 시 높은 활성을 보인 시료들을 대상으로 2차 활성검색을 실시한 결과, Fig. 3에 나타난 것처럼 이들을 가지고 재현성을 검토한 결과 유자의 활성이 높음이 밝혀졌다. 또한 수율을 조사한 결과도 마찬가지로 유자가 높게 나타났다. 저해활성과 수율 (43%)을 고루 만족시키는 점을 고려하여 유자를 시료로 선정하였다. 선정된 유자는 다시 외피와 과육 부분으로 나누어 methanol로 추출하였고 저해활성이 높고 잔류 농약에 대한 독성 위험이 상대적으로 낮은 과육 부분을 최종 선정하게 되었다 (Table 3-1-2).

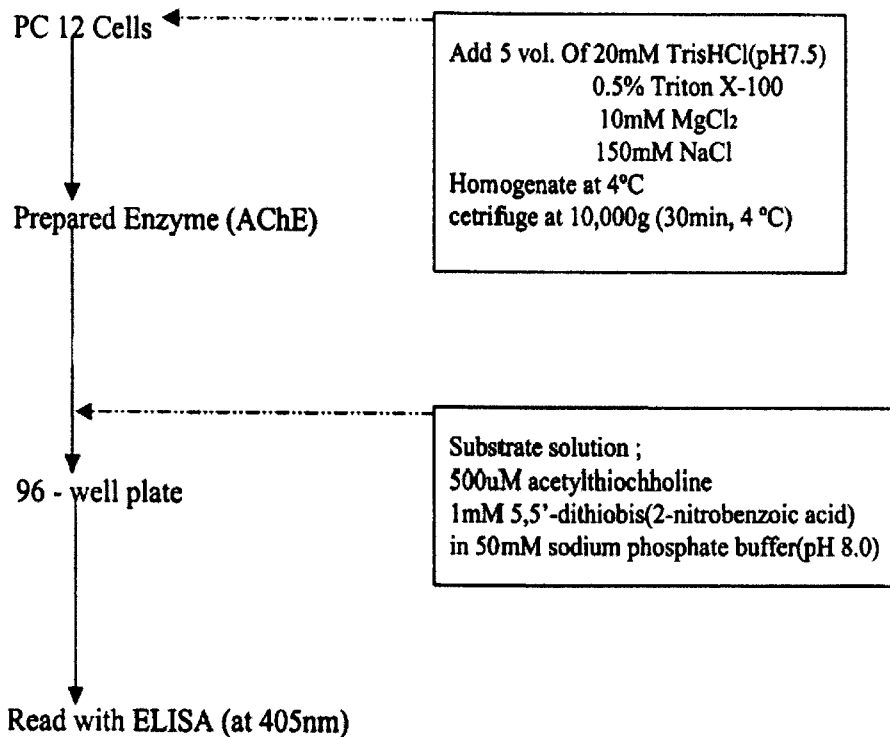


Fig 3-1-1. ELISA assay for Acetylcholinesterase inhibition (AChE)

**Table 3-1-2. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory effect of the extract from various plants extracts.**

Scientific name	Common name	Fr. 3
<i>Achyranthes ascendens</i>	Amaranth	24.83
<i>Allium cepa L.</i>	Onion	5.03
<i>Allium fistulosum L.</i>	Scallion (thick)	18.95
<i>Allium fistulosum L.</i>	Scallion	25.26
<i>Allium fistulosum L.</i>	Scallion (thin)	39.36
<i>Allium fistulosum L.</i>	Scallion (thin young)	20.83
<i>Allium monanthum</i>	Wild rocamboles	0
<i>Allium ouensanense L.</i>		17.43
<i>Allium sativum L.</i>	Garlic (young)	7.27
<i>Allium sativum L.</i>	Garlic (leaf)	0
<i>Allium sativum L.</i>	Garlic (trunk)	3.88
<i>Allium sativum L.</i>	Garlic	0
<i>Allium schoenoprasum</i>	Chives	25.47
<i>Allium tuberosum L.</i>	Leek (leaf)	3.97
<i>Allium tuberosum L.</i>	Leek (trunk)	14.18
<i>Allium tuberosum L.</i>	Leek (from China)	14.64
<i>Amaranthus mangostanus L.</i>		26.53
<i>Anethum graveolens L.</i>	Dill seed	24.67
<i>Angelica archangelica L.</i>		19.01
<i>Apium graveolens L.</i>	Celery	12.7
<b><i>ApiumgraveolensL.</i></b>	Celery (seed)	52.38
<i>Aralia elata seemann</i>	Japanese anelica tree	6.79
<i>Armoracia rusticana</i>	Horseradish	34.47
<i>Artemisia draccuculus</i>	Tarragon	14.61
<i>Artemisia vulgaris</i>	Mugwort	18.39
<i>Astar scaber</i>	Chwi	0
<i>Beta vulgaris</i>	Beet	8
<i>Beta vulgaris var.</i>	Swiss chard	9.98
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf	0
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf (wild type)	21.49
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf	36.16
<i>Brassica alba</i>	Mustard leaf	21.6
<i>Brassica alba</i>	Mustard	10.61
<i>Brassica alba</i>	Mustard (trunk)	15.9
<i>Brassica oleracea L. botrytis</i>	Cauliflower	6.55
<i>Brassica oleracea L. capitata</i>	Cabbage	38.09
<i>Brassica oleracea L. var. italica</i>	Broccoli	19.25

continued

Scientific name	Common name	Fr. 3
<i>Brassica oleracea L. var. acephala</i>	Kale	10.81
<i>Brassica rapa</i>	Green vitamin (young)	39.84
<i>Brassica rapa</i>	Green vitamin	12.45
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Pickpurse	11.13
<i>Capsicum annuum L.</i>	Paprika	12.52
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper corn (pink)	12.3
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper corn (green)	20.83
<i>Capsicum annuum L.</i>	Green bell pepper	17.4
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper (leaf)	36.52
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper (seed)	23.65
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper (trunk)	17.9
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pimento (sweet pepper)	10.63
<i>Carum carvi</i>	Caraway	21.3
<i>Chilicon carne</i>	Pepper (hot)	7.38
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Crown daisy	33.38
<i>Cichorium endivia</i>	Endive	14.63
<i>Cicorium intybus L.</i>	Chichory (root)	7.88
<i>Cicorium intybus L.</i>	Chichory (leaf)	10
<i>Cicorium intybus L.</i>	Chichory (red)	10.8
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamon	26.08
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriander	12.25
<i>Coriandrum sativum L.</i>	Coriander (Mexico)	32.31
<i>Crocus sativus</i>	Saffron	20
<i>Cuminum cyminum</i>	Cummin	31
<i>Cymbopogon citrus</i>	Lemon	13
<i>Curcuma longa L.</i>	Turmeric	12
<i>Cucurbita moschate</i>	Pumpkin leaf	16.34
<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamon	17.06
<i>Eugenia caryophyllate</i>	Clove	17.5
<i>Eruca vesicaria</i>	Summer salad	36.34
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fennel	20.71
<i>Hemerocallis fulva</i>	Kuansh	17.68
<i>Illicium verum Hooker</i>	Star anis	4
<i>Ipomoea batatas</i>	Sweet potato	7.66
<i>Ixeris dentata</i>	Lettuce (green)	33.23
<i>Laurus nobilis</i>	Bay laurel	15.81
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type	21.97
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (leaf)	31.36

continued

Scientific name	Common name	Fr. 3
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (young)	20.62
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (flower)	36.71
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (old)	30.21
<i>Malva verticillate</i>	Mallow	18.51
<i>Medicago sativus</i>	Alfalfa	1.8
<i>Mentha spp</i>	Mint	13.63
<i>Myristica fragrans Houtt</i>	Nutmeg	15.3
<i>Myristica fragrans Houtt</i>	Mace	25.82
<i>Ocimm basilicum L.</i>	Basil	18.37
<i>Oenanthe javanica</i>	Drop wort (wild type)	11.85
<i>Oenanthe javanica</i>	Drop wort	24.16
<i>Origanum vulgare L.</i>	Oregano	22
<i>Papaver somniferum</i>	Poppy seed	2.54
<i>Paphanus acanthiformis</i>		11.17
<i>Perilla frutescra</i>	Perillae folium (leaf)	4.46
<i>Perilla frutescra</i>	Perillae folium (trunk)	25.56
<i>Perilla frutescra</i>	Perillae folium (young leaf)	14.98
<i>Perilla frutescra</i>	Perillae folium (green leaf)	12.16
<i>Petasites japonicus</i>	Butter bur	32.47
<i>Petroselinum crispum</i>	Italian seasoning	9.8
<i>Petroselinum crispum</i>	Parsley (leaf)	15.66
<i>Petroselinum crispum</i>	Parsley	4
<i>Physalis francheti</i>	Green young pepper	12.38
<i>Pimenta dioicalis</i>	Allspice	23.67
<i>Pimpinella anisum</i>	Anise	20.16
<i>Pimpinella brachycarpa</i>	Young	31.19
<i>Pimpinella brachycarpa</i>		22.7
<i>Pipper nigrum L.</i>	Pepper (black)	10.58
<i>Pipper nigrum L.</i>	Pepper (white)	10.31
<i>Raphanus sativus</i>	Raddish	19.13
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosemary	5.3
<i>Salvia officinalis</i>	Sage	18.9
<i>Sedum sarmentosum</i>	Stringy stone crop	15.96
<i>Sinapis alba L.</i>	Mustard	14.78
<i>Taraxacum officinale L.</i>	Dandelion	24.21
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	23.89
<i>Trigonella foenungraecum</i>	Fenugreek	24.8
<i>Valerianella locusta</i>	Corn salad	12.45
<i>Vilola diamantica</i>	Butter bur leaf	10.96

continued

Scientific name	Common name	Fr. 3
<i>Wasabia japonica</i>	Wasabia	7
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	5.03
<i>Petasites japonicus</i>	Butter bur	32.47
<i>Petroselinum crispum</i>	Italian seasoning	9.8

\*AChE activity (%): The percentage of enzyme activity value for each sample was calculated with the control activity (100%). The final concentration of each sample in assay mixture was 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

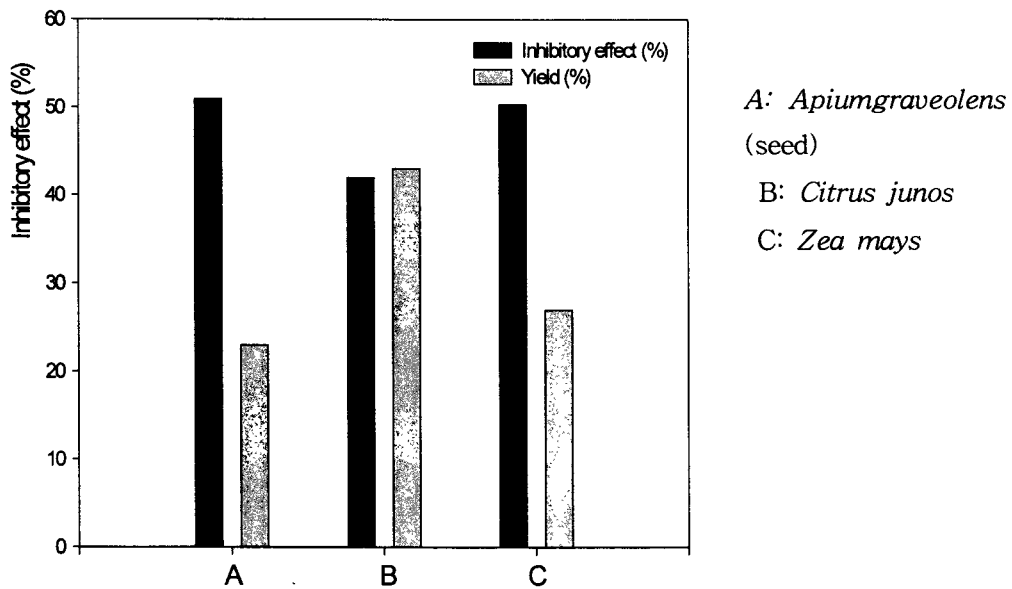


Fig 3-1-3. AChE inhibitory effect of methanolic extracts obtained from edible plants.(Sample conc. was 130  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .)

Table 3-1-3. AChE inhibitory effect of *Citrus junos* methanolic extracts.

Scientific name	Common name	Fr. III
<i>Citrus junos</i>	유자차 (과피)	38
<i>Citrus junos</i>	유자차 (과육)	54



나. 선정된 acetylcholinesterase 저해 물질의 *in vivo*상의 독성실험

유자 (*Citrus junos*) 과육에 대한 methanol 획분을 농도별 (0, 100, 500, 1500 mg/kg)로 하여 독성 실험을 실시한 결과 급성독성 실험 전·후의 body weight check에서 비정상적인 변화는 발견되지 않았다. 특히 농도에 관계없이 각 group의 모든 mice의 생존율이 100%였고, serum의 GPT (glutamic pyruvate transaminase), GOT (glutamic oxaloacetate transaminase) 변화도 SAS analysis 결과 유의성을 보이지 않음으로서 선정된 sample의 독성은 없는 것으로 확인되었다 (Table 3-1-4, 5, 6).

Table 3-1-4. Body weight and survival rate of mice orally administrated *Citrus junos* on acute toxicity.

Group	No. of mice	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	No. of mice survived	Survival rate (%)
Control	10	28.2 ± 4.5	33.5 ± 2.7	10	100
100 mg/kg	10	27.1 ± 4.7	31.2 ± 2.5	10	100
500 mg/kg	10	27.6 ± 3.8	32.4 ± 1.9	10	100
1,500 mg/kg	10	26.3 ± 5.1	30.3 ± 1.5	10	100

Table 3-1-5. Effect of *Citrus junos* methanolic extract on GPT in ICR mouse for 10 days.

	GPT (glutamate pyruvate transaminase)
Control	3.95 ± 1.20 <sup>1)a</sup>
100 mg/kg	2.90 ± 0.43 <sup>a</sup>
500 mg/kg	3.32 ± 0.64 <sup>a</sup>
1,500 mg/kg	3.11 ± 0.54 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Values represent the means (n=3) ± S.D.

<sup>a)</sup>Duncan's multiple range tests of SAS (statistical analysis system) showed no difference (P<0.05).

**Table 3-1-6. Effect of *Citrus junos* methanolic extract on GOT in ICR mouse for 10 days.**

GOT (glutamate oxaloacetate transaminase)	
Control	386.1 ± 255.7 <sup>1)a</sup>
100 mg/kg	188.6 ± 181.1 <sup>a</sup>
500 mg/kg	346.1 ± 175.1 <sup>a</sup>
1,500 mg/kg	217.3 ± 120.9 <sup>a</sup>

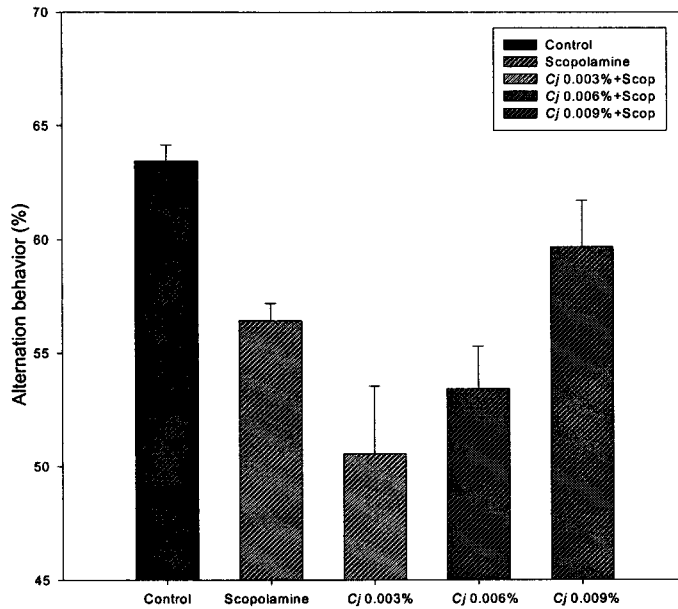
<sup>1)</sup>Values represent the means (n=3) ± S.D.

<sup>a)</sup>Duncan's multiple range tests of SAS (statistical analysis system) showed no difference (P<0.05).

#### 다. 선정된 acetylcholinesterase inhibitor의 *in vivo* 인지능력 실험

##### 1) Y-maze test

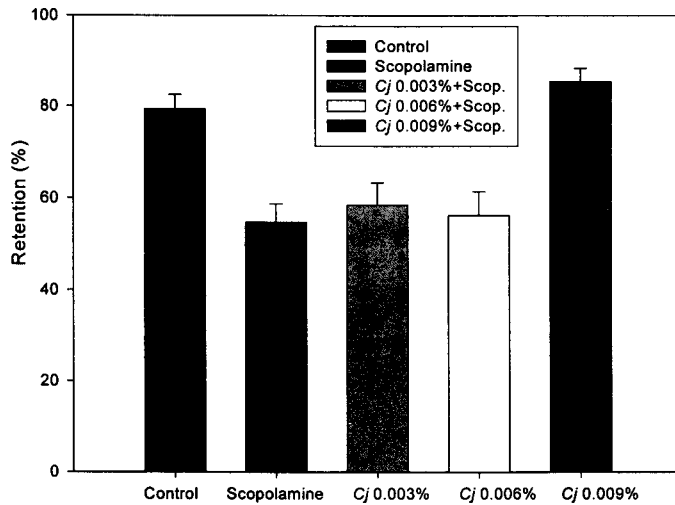
Scopolamine group은 sample을 먹이지 않은 group에 scopolamine을 투여하였고, 나머지는 sample을 위에서 언급한 각각의 농도 (0.003, 0.006, 0.009%)로 투여하였던 group에 scopolamine을 주사하여 실험을 실시하였다. Scopolamine을 주사하지 않은 control group은 scopolamine group에 비해서 약 15% 이상의 안정된 brain 활성을 나타내었고 0.003, 0.006%의 sample 투여 group은 scopolamine의 저해 활성을 극복시키거나 보완/예방하지 못하였다. 하지만 0.009%를 투여한 group은 control group의 brain 활성과 비교할 때 control 대비 약 90%의 활성을 보였다. 이는 0.009%의 유자 sample (*Citrus junos*)이 scopolamine의 효과를 blocking하여 거의 control 수준의 brain 활성으로 회복시켰음을 의미 한다 (Fig 3-1-8).



**Fig 3-1-8. Effects of *Citrus junos* on spontaneous alternation behavior in the scopolamine treated mice.** Spontaneous alternation behavior is during an 8 min session in the Y-maze task were measured. Values indicate mean  $\pm$  S.E (n=10). Scopolamine is 1mg/kg.

## 2) Passive avoidance test

Scopolamine을 주사하지 않은 control group은 scopolamine group에 비해서 약 30% 정도의 안정된 학습능력을 나타내었고 0.003, 0.006%의 sample 투여 group은 scopolamine의 뇌세포 신호전달 저해 활성을 극복시키거나 보완/예방하지 못하였다. 하지만 0.009%를 투여한 group은 control group의 학습능력 활성과 비교할 때 control group을 상회하는 인지능력의 회복을 보여주었다. 이는 0.009%의 유자 (*Citrus junos*) sample이 scopolamine의 뇌세포 신호전달 저해 효과 (인지능력과 학습능력의 상실유도)를 blocking하여 control group이 보여주는 인지 능력을 나타내어줌으로써 뇌세포 신호전달을 정상적으로 보호/회복시켜줌을 확인하였다 (Fig 3-1-9).

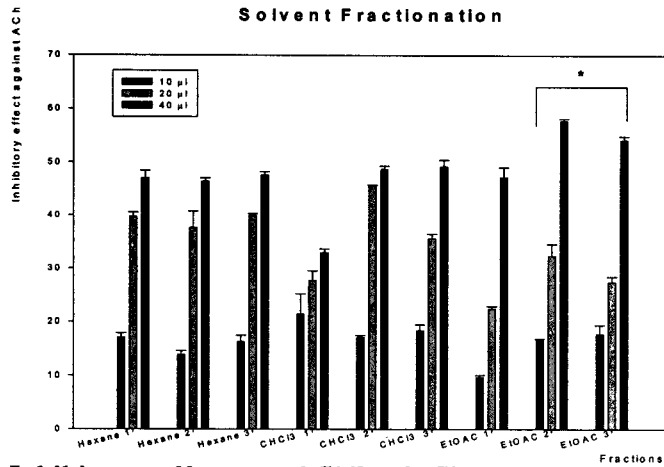


**Fig 3-1-9. Effects of *Citrus junos* on retention percentage in the retention trial of the multi-trial passive avoidance task in the scopolamine treated mice.** Values indicate mean  $\pm$  S.E. (n=10). Scopolamine is 1mg/kg.

#### 라. 선정된 acetylcholinesterase inhibitor의 정제

##### 1) 유자에서의 저해 활성 물질의 탐색을 위한 1차 물질 분리

선정된 유자 (*Citrus junos*)를 methanol로 추출하고 추출된 crude methanolic extract는 극성도에 따라 solvent partitioning을 실시하여 ethyl acetate fraction에서 55% 이상의 저해활성을 확인하였다 (Fig 3-1-10).

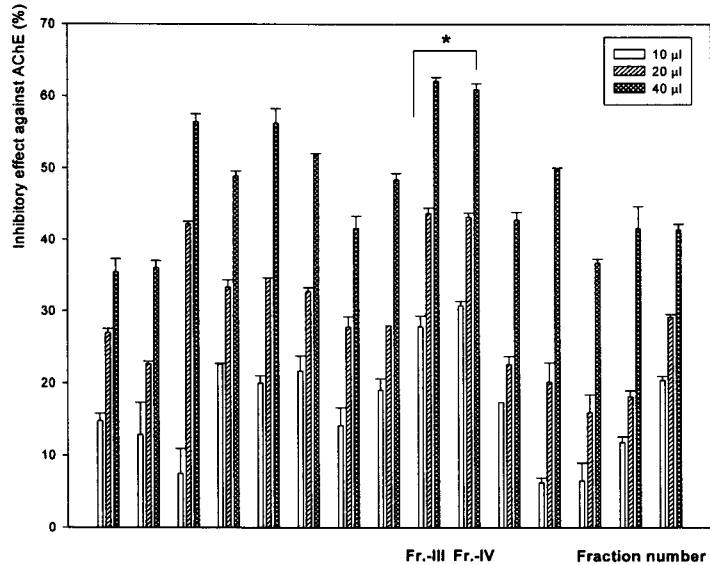


**Fig 3-10 Inhibitory effect on AChE of *Citrus junos* fractionated by the solvent partitioning.** The percentage of enzyme activity values for each fraction was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 71 µg/ml. Values present the means (n = 2) ± S.E. \*: The highest inhibition activity against AChE.

**2) First silica-gel column chromatography에 의한 유자(*Citrus junos*) methanol 추출물의 AChE에 대한 억제 활성**

Solvent partitioning 한 후의 ethyl acetate 층을 가지고 first open silica-gel column chromatography를 시행하였다. 11 개의 소분획으로 나누어 각각의 저해 활성을 측정하였다. 소분획 중에서 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 80:20, 70:30)의 분획이 AChE의 활성을 60%로 유의성 있게 저해시킴을 알 수 있었다 (Fig 3-1-11).

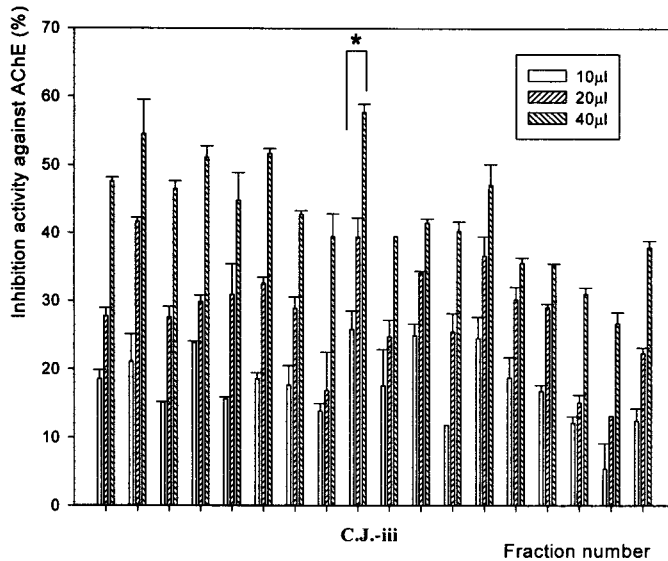
### First silica-gel column chromatography



**Fig 3-1-11. Inhibitory effect of on AChE of *Citrus junos* fractionated by the first silica-gel column chromatography.** The high inhibitory effect of fraction is 60%. The percentage of enzyme activity value for each fraction was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 71  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Values present the means ( $n=2$ ) $\pm$ S.E. Solvent ratio is Chloroform: Methanol = (80:20), (70:30). \*: The highest inhibitory effect against AChE.

### 3) Second silica-gel column chromatography에 의한 유자(*Citrus junos*) methanol 추출물의 AChE에 대한 억제 활성

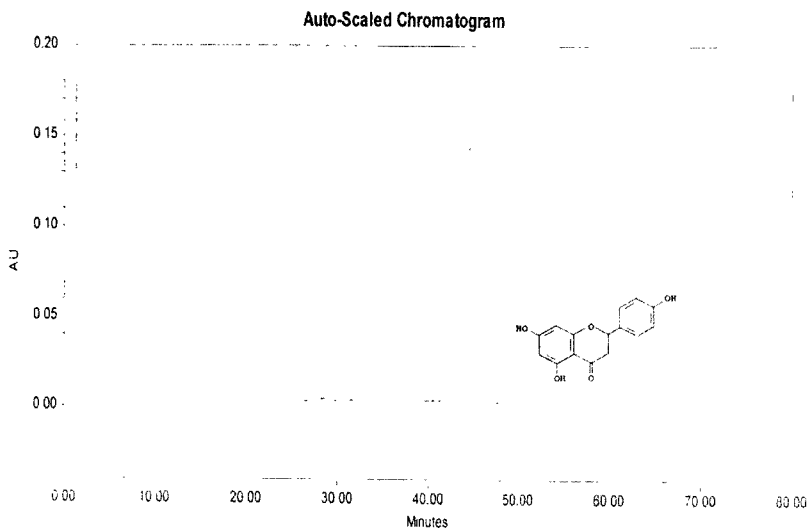
1차 open silica-gel column chromatography를 시행한 후의 ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 80:20, 70:30$ ) 소분획 (5g)을 가지고 2차 open silica-gel column chromatography를 시행한 결과 13개의 소분획 중 ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 86:14$ )의 분획 (4 mg)에서 58%의 저해 활성을 보였다 (Fig 3-1-12). 이 분획은 0.08%의 수율을 보였다.



**Fig 3-1-12. Inhibitory effect of on AChE of *Citrus junos* fractionated by the second silica-gel column chromatography.** The high inhibitory effect of fraction is 58%. The inhibitory effect for each fraction was expressed as the percentage of the enzyme activity compared to the control value (100%). Sample concentration was 71  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Values present the means ( $n=2$ )  $\pm$  S.E. Solvent ratio is (Chloroform : Methanol = 86:14). \*: The highest inhibitory effect against AChE.

#### 4) HPLC에 의한 *Citrus junos* methanol 추출물의 활성 물질 분리

2차 open silica-gel column chromatography에서 저해 활성이 높았던 분획 부분을 가지고 HPLC로 분리하였다. Waters 2690 HPLC에서 PDA detector와  $\text{C}_{18}$  reverse column을 사용하였다. UV detector로 흡광도 235 nm에서 peak을 확인하였으며 EI-Mass와  $^1\text{H-NMR}/^{13}\text{C-NMR}$ 을 이용하여 활성 물질의 구조가 naringenine임을 밝혔다. (Fig 3-1-13).



**Fig 3-1-13.** Gradient reversed phase Waters 2690 HPLC analysis of AChE inhibitor from *Citrus junos*. ( $\mu$ -bondapak C<sub>18</sub> reverse column : 3.9 × 300 mm, mobile phase, a 80 min gradient of 0-100% methanol in water, flow rate, 1.0 ml/min : UV detector, absorbance monitor operating at 235 nm. Injection volume was 20  $\mu$ l)



## 제 2절 뇌기능 신경전달물질 합성효소 활성화 미량소재의 실용화의 내용 및 결과

### 1. 서설

고도의 경제성장과 함께 현대 사회는 복지수준의 향상과 의료 기술의 향상으로 인해 사람들의 평균수명이 점차 늘어가고 있으며 이에 따라 노인성 질환에 대한 관심, 특히 치매에 대한 관심이 증가되고 있다. 실제로 치매의 발병율은 60세 이상에서 증가되는 것으로 알려져 있다 (10%~47%). 우리나라에서 뿐만 아니라 미국, 일본, 중국 등지에서도 그 발병율과 그에 따른 사망률은 해마다 증가되어 그에 따른 크나 큰 사회적 문제를 일으키고 있다. 치매의 형태는 다양한데 50%는 알츠하이머성 치매, 20~30%는 혈관성 치매, 그리고 나머지는 알코올성 치매와 파킨슨병 치매 등이 있으며 그 중 15~20%는 알츠하이머와 혈관성 치매를 동시에 앓고 있는 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)은 대부분 치매의 일반적 형태이며 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 노령화가 되고 있는 현대사회에서 최대의 질환일 뿐만 아니라 21세기에 당면할 심각한 문제가 될 것으로 예상된다. 치매는 초기에 건망증으로 시작해서 기억력, 추상적 사고력, 창의력의 상실, 판단력의 저하 등이 점차적으로 일어나며 시간 감각과 방향감각의 상실까지 일어나 결국엔 일상적인 생활을 할 수 없게 되고 결국엔 죽음에 이르게 된다. 알츠하이머병의 원인은 여러 연구의 진행이 있었음에도 불구하고 아직까지 정확하게 밝혀진 바가 없으며 단지 신경전달물질인 acetyl choline의 수준을 높이는 것으로 대부분 치료의 목적을 두고 있다. Acetylcholine의 생성을 직접적으로 활성화 시켜주는 인자가 choline acetyltransferase (ChAT)로 알려져 있는데 이것은 뇌의 전두엽의 cholinergic neuron에 존재한다. 뇌의 전두엽 (basal forebrain)은 cholinergic neuron을 상당수 포함하고 있고, 이 부위에 있는 cholinergic neuron이 인지능력을 관장하고 있는 것으로 보인다. 노인성 치매환자에 있어서 ChAT의 양은 급격히 감소되는 것을 볼 수 있고, ChAT의 활성화 감소되어 acetylcholine의 농도가 낮아진다. ChAT는 신경의 pre-synaptic 부분에서 choline과 acetyl-CoA로부터 acetylcholine을 생성하는 효소로 활성을 증진시켜주기 위해 신경성장인자 (nerve growth factor, NGF)나 신경영양물질 (neurotrophin)을 투여하기 위한 연구도 진행중이지만, 이는 drug delivery에서 문제점을 갖고 있다. 인간의 두뇌는 강력한 뇌막 (blood brain-barrier)으로 보호를 받고 있고, 이 막은 특정물질에 대한 선택성을 보이기 때문에 생리적으로 단백질과 지방과 같은 큰 분자량을 갖는 물질의 투과가 쉽지 않다. ChEIs와는 달리, 환자의 인지능을 향상시켜 주기 위한 ChAT activator로 보고된 FDA 승인 약품은 아직 없으나 최근 일본 Kitasato 연구소에서 한약재로부터 NGF-like factor를 찾아냈고, 이 물질이 ChAT 활성을 증진시

킨다는 보고가 있었다.

본 연구에 사용한 대추 (*Zizyphus jujuba*)는 경남 밀양 산으로 낙엽 활목 교목으로 주요 성분은 단백질, 당류, 유기산, 점액질, 비타민 A, B<sub>2</sub>, C와 칼슘, 칼륨, 인, 무기질과 betulm, triterpenoid, betulic acid 이 있다. 대추는 내장기능을 특특히 하며 신경을 안정시키고 노화를 방지하며 신경 안정작용이 있다고 하며 또한 이뇨작용과 간기능 회복작용, 그리고 담즙 분비를 촉진하는 작용을 가지고 있다고 알려져 있다. 그 밖에 타액 부족, 견인통, 복통, 제독, 식욕부진에 효과가 있는 것으로 전한다.

본 연구에서는 160 여종의 식·약용 생물자원이 추출물에 대하여 cholinacetyl transferase (ChAT) 활성 검색과정에서 가장 높은 활성을 보인 대추 (*Zizyphus jujuba*)의 methanol 추출물로부터 활성물질은 분리하여 그것의 ChAT 활성 효과와 인지력 향상 효과를 조사하고 아울러 그 구조적 특징을 조사하여 산업화하고자 하였다.

## 2. 재료 및 실험방법

### 가. 재료

본 실험에 사용한 시료들은 서울 경동시장에서 직접 구입하였다. Cholineacetyl transferase 활성도를 측정하기 위해 choline chloride와 eserinhemisulfate, sodium tetraphenylborate, toluene은 Sigma 제품을 사용하였으며, acetyl coenzyme A [acetyl-1-<sup>14</sup>C]는 NEN (Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Aquasol은 Packard(CT, USA)에서 구입하였으며 cell culture를 위하여 minimum essential medium과 FBS (fetal bovine serum), Trypsin-EDTA, Penicillin-Streptomycin은 Gibco-BRL™ (Gaithersburg, MD, USA)제품을 사용하였다. 시료의 분석을 위해 Analytical HPLC column은  $\mu$ -bondapack C<sub>18</sub> reverse phase (3.9 × 300mm)를 Waters Co. (Miliford MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 인지능력 실험을 위해 ICR mouse를 샘타코에서 분양받아 사용하였다. 그 밖의 분석에 사용한 시약은 모두 특급 수준의 시약을 사용하였다.

### 나. 실험 방법

#### 1) Choline acetyltransferase 활성 물질의 검색시료 제조

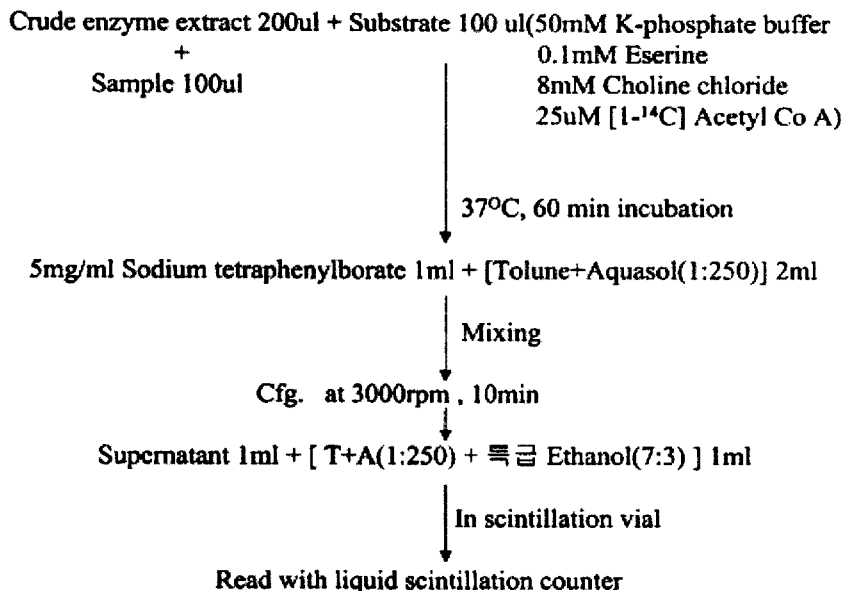
160 여종의 식·약용 생물자원을 세부과제 1과 같이 계통추출 하였다. 구입한 시료를 파쇄한 재료와 파쇄하지 않은 재료로 구분하여 위의 추출 방법에 따라 100℃에서 5분간 끓여서 효소 활성을 실험시키고 분쇄한 후 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상등액을 동결건조 하여 Fr. I의 시료를 조제하였다. 침전물은

건조시킨 후 연속적으로 hexan, methanol, ethyl acetate 순으로 환류추출 한 뒤 각각의 상등액을 농축, 동결건조 하여 Fr. II, III, IV을 얻었다.

## 2) Choline acetyltransferase 활성 효과 측정

가) Choline acetyltransferase 의 assay계 확립

MC-IXC cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 MEM 배지에서 배양하여 세포 수가  $10^7$ - $10^8$  cell/ml가 되었을 때 cell lysis buffer를 이용하여 cell로부터 choline acetyltransferase (ChAT)를 조제한다. Enzyme의 농도는 Bradford 법을 이용하여 측정한다. 10,000 x g에서 원심분리하여 얻은 crude enzyme (ChAT)와 기질용액 (50 mM Potassium phosphate buffer, 0.1 mM Eserine, 8 mM Choline chloride)과  $25 \mu\text{M}$  [ $1$ - $^{14}\text{C}$ ]Acetyl Co A를 넣고 반응시킨 후 toluene과 Aquasol의 cocktail용액을 넣고 반응 정지시켜서 그 상등액을 liquid scintillation counter를 이용하여 측정한다 (Scheme 3-2-1).



Scheme 3-2-1. ChAT assay for screening.

나) Choline acetyltransferase 활성의 2차 검색 방법

MC-IXC cell을 antimicrotics/antibiotics를 함유한 MEM 배지에서 배양하여 세포수가  $10^6$ - $10^7$  cell/ml가 되었을 때 추출한 sample을 첨가한다. 3일

경과 후 cell lysis buffer를 이용하여 cell로부터 choline acetyltransferase (ChAT)를 조제한다. 10,000 x g에서 원심분리하여 얻은 ChAT를 기질용액 (8 mM choline chloride) 90  $\mu$ l와 25  $\mu$ M [ $^{14}$ C] acetyl CoA를 첨가하여 37°C에서 60 분간 incubation시킨다. 생성된 지용성 acetylcholine을 5 mg/ml sodium tetraphenyl borate로 3,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 취하고 이를 liquid scintillation counter로 측정함.

\* 활성도(%)

$$= \{(\text{sample reaction} - \text{enzyme reaction}) / (\text{enzyme reaction})\} \times 100$$

다) 용매별 추출획분에서의 choline acetyltransferase 활성 검색

위에서 확립한 assay계를 이용하여 활성을 검색한다. 상기에서 추출한 각각의 획분을 1 mg/ml의 시료로 만든 후 그 중 100  $\mu$ l (250  $\mu$ g/ml)을 기질, enzyme과 함께 넣어 반응 시켜 그 활성을 측정한다.

### 3) 대추로부터의 choline acetyltransferase 활성물질의 정제

가) Choline acetyltransferase 활성 물질의 분리

선정된 대추 (*Zizyphus jujuba*)를 씨를 제거 하고 과육만 hand mixer로 곱게 마쇄 한 후 methanol 5 배 부피로 4°C에서 2주 동안 정치시키면서 2회 추출한 후 감압 농축하여 대추 methanol 추출물을 조제하였다. 추출된 crude methanolic extract는 극성도에 따라 solvent partitioning을 실시하여 ChAT 활성을 확인하였다. 활성이 높게 나온 부분을 가지고 open silica gel column chromatography (Chloroform: Methanol)을 시행하여 11개의 소분획(CHCl<sub>3</sub>:MeOH= 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)으로 분획 하였다. 각각의 분획을 가지고 활성을 측정하여 그 중 활성이 높은 획분을 선정하여 2차 open silica gel column chromatography (chloroform: methanol)시행하여 11개의 획분 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH= 100:0, 90:10, 88:12, 85:15, 83:17, 80:20, 78:22, 75:25, 70:30, 70:30, 100:0)으로 나누고 그 중 활성이 가장 높은 획분을 분리하였다.

나) HPLC에 의한 대추 (*Zizyphus jujuba*)의 ChAT 활성 물질 분리

Waters 2690 HPLC와 Waters  $\mu$ -bondapack C<sub>18</sub> revers phase (3.9 × 300 mm) column을 사용하였다. 0-100%의 methanol과 물의 직선농도 구배로 변화를 주어 80분간 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는 분당 1.0 ml로 하였으며 한번에 20  $\mu$ l씩 시료 주입을 하였다. 사용 용매는 특급 methanol과 3차 증류수를 사용하였다(Table 3-2-1)

**Table 3-2-1. Condition of the analytical HPLC for purification of ChAT activator from *Zizyphus jujuba*.**

Instrument	Waters 2690
Detector	Waters 996 (at 235 nm)
Column	$\mu$ -bondapak C18 (reverse phase, 3.9 × 300 mm)
Flow rate	1 ml/min
Mobile phase	0%~100% Methanol (gradient elution)
Injection volume	0.02 ml

다) 정제물질의 NMR 및 EI mass 분석

HPLC에서 정제된 물질과 내부 기준 물질 (didzein)을  $^1\text{H-NMR}$  (600MHz)과  $^{13}\text{C-NMR}$  (MHz) (Brucker German, Advace-600)를 이용하여 측정하였으며, 정제된 물질을 Electronic ionization (EI) mass (JEOL, JMS-AX505WA)를 이용하여 그 구조와 mass size를 보았다.

#### 4) Choline acetyltransferase 활성 물질의 *in vivo*상의 독성실험

실험동물로 ICR mouse (5주령)를 사용하여 2일간 적응시킨 후 조식료를 0, 100, 500, 1500 mg/kg의 sample은 각 group당 준비된 10마리의 mouse에 매일 오전에 경구투여를 하였고 mouse는 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photo-period chamber에서 food and water를 *ad lib.* 의 상태로 공급하였다. 독성 여부를 보기 위해 몸무게의 변화와 간 독성을 측정하였다.

가) 급성 독성과 몸무게의 변화

급성독성을 보기위해 생존율(%)과 몸무게의 변화를 보았다.

나) GOT (glutamic oxaloacete transaminase) 및 GPT (glutamate pyruvate transaminase) 활성도

간 독성을 보기위해 GOT, GPT kit을 이용하여 혈청에서 검사하였다. 각각의 기질을 1 ml 씩 시험관에 넣고 37°C 수조에서 가온한 후 혈청 0.2 ml씩 넣은 후 GOT의 경우 60 분, GPT의 경우 30 분간 반응시킨 다음 발색액 2,4-dinitrophenyl hydrazine을 1.0 ml 씩 넣고 실온에서 20 분간 반응시킨 후 0.4 N-NaOH을 10.0 ml씩 넣어 반응을 중지 시켰다. 반응 중지 30 분 후에 505 nm 에서 측정하고 여기서 얻은 검량 곡선을 이용하여 효소의 활성단위로 환산하였다.

## 5) Choline acetyltransferase 활성 물질의 *in vivo*상의 인지능력 검사

*In vivo* behavioral test를 위한 sample은 2가지의 농도 (0.003, 0.006%)로 준비하였다. ICR-mouse는 정상군, 대조군, 각 농도에 따른 실험군으로 하여 5group으로 나누고 각 group당 10마리씩 배분하였다. 정상군과 대조군은 일반 식이와 물을 주었고 실험군들은 각각의 농도 (0.003, 0.006%)로 시료를 투여하였다. Mouse는 20-24 °C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photoperiod chamber에서 모든 식이와 물은 *ad lib.* 로 공급하였다.

### 가) Y-maze test

치매 유발 물질로 Scopolamine (1.0 mg/kg) 100  $\mu$ l을 대조군과 실험군에 주사하여 일시적인 memory impairment를 유도 한 다음 30 분 후 실험을 실시한다. 정상군은 scopolamine 대신에 sodium chloride 0.85% (W/V)를 주사하였다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms을 기록했다. Mouse를 arm에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.

### 나) Passive avoidance test

모든 mouse를 실험 전날 실험 상자에서 적응 훈련 (명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험한다. 실험 당일 Scopolamine (1.0 mg/kg) 100  $\mu$ l을 복강 주사하여 memory impairment을 유도한 다음 30 분 후 test를 실시하여 암실로 들어가는 시간 (Step through latency)을 측정한다. 대조군은 정상 사육한 다음, 시험당일 sodium chloride 0.85% (w/v)을 주사한다.

## 3. 결 과

### 가. 식·약용 생물자원으로부터의 choline acetyltransferase 활성 검색

#### 1) Choline acetyltransferase 활성 성분의 assay 계 확립

노인성 치매에 있어서 신경전달 물질인 acetylcholine을 합성시켜 주며 뇌기능을 유지시켜 주는 효소로 보고 되어 있는 choline acetyltransferase를 활성화시키는 물질의 assay 계를 neuroblastoma cell line (MC-IXC) 이용하여 S초든 3-2-1 같이 확립했다.

#### 2) Choline acetyltransferase 활성물질의 검색 및 선정

차·죽류 등과 같은 식·약용 생물자원을 대상으로 총 160 여종의 시료를 본 assay 계에 적용하여 냉수 추출 획분 (Fr. I), hexane 추출 획분 (Fr. II),

methanol 추출획분 (Fr. III) 및 열수 추출획분 (Fr. IV)을 대상으로 검색한 결과 (Table 3-2-2) 계피차(*Cinnamomum Loureirii*) 냉수 추출물, 귤피차(*Citrus unshiu*) methanol 추출물, 대추(*Zizyphus jujuba var. inermis*) methanol 추출물에서 각각 40.8, 63.8, 62.1%의 활성을 보였다. 1차 활성검색 시 높은 활성을 보인 시료들을 대상으로 2차 활성검색을 실시한 결과, Table 3-2-3에 나타난 것처럼에서의 대추의 methanol 추출물이 가장 높은 활성을 가지고 있음이 밝혀졌다. 합성효소의 활성화 효과와 수율을 고루 만족시키는 점을 고려하여 대추를 선정하였다.

Table 3-2-2. Cholineacetyltransferase (ChAT) activation effect of the extract from natural edible plants.

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Diospyros kaki</i>	감입차	-	-10.0
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	감초차	7.4	10.7
<i>Glycine max</i>	검정콩차	-1.5	—
<i>Cassia tora</i>	결명자차	-27.6	-25.0
<i>Cinnamomum loureirii</i>	계피차	<b>40.8</b>	-22.3
<i>Lycium chinense</i>	구기자차	-7	32.8
<i>Citrus unshiu</i>	귤피차	-7	<b>63.8</b>
<i>Capsella bursa-Pastoris</i>	냉이차	18.8	-9.4
<i>Cinamomum camphora</i>	녹차	-	-15.8
<i>Laminaria japonica</i>	다시마차	-	0.5
<i>Astragalus membranaceus</i>	단더섬차(황기)	1.4	3.9
<i>Angelica gigas</i>	당귀차	9.1	3.9
<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	대추차	18.1	<b>62.1</b>
<i>Codonosis lanceolata</i>	더덕차	-8.6	9.5
<i>Platycodon grandiflorum</i>	도라지차	20.7	-21.5
<i>Eucommia ulmoides</i>	두충차(껍질)	-22.4	10.3
<i>Eucommia ulmoides</i>	두충차(잎)	-	-2.1
<i>Polygonatum japonicum</i>	등글레차(잎)	-	—
<i>Polygonatum japonicum</i>	등글레차(줄기)	-	—
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	들국화차	-	-10.7
<i>Perilla frutescens</i> Var. <i>japonica</i>	들깨차	-	—
<i>Pseudocydonia sinensis</i>	모과차	-	-12.1
<i>Taraxacum platycarpum</i>	민들레차	-	-6.0
<i>Menta arvensis</i> var. <i>japonica</i>	박하차	-	-8.9
<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill.	백년초차	-	-5.1
<i>Saboten Makino</i>			
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexastichon</i>	보리차	-	—
<i>Eribotrya japonica</i>	비파잎차	-	-3.3
<i>Morus alba</i>	뽕잎차	-	8.3
<i>Rubus coreanus</i>	산딸기차	-	—
<i>Cornus officinalis</i>	산수유차	-	8.3
<i>Epimedium koreanum</i>	삼지구엽차(음양곽)	12.8	-6.1
<i>Atractylodes japonica</i>	삼주차(창출)	-	11.5

(continued)



Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Punica granatum</i>	석류차	-	-28.5
<i>Zingiber officinale</i>	생강차	-	-
<i>Pinus densiflora</i>	솔잎차	-	3.8
<i>Artemisia asiatica</i>	쑥차	-	-13.7
<i>Nelumbo nucifera</i>	연차	-	-8.8
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	오갈피차	-	-15.9
<i>Schizandra chinensis</i>	오미자차	-	-25
<i>Zea mays</i>	옥수수차	1.9	2.3
<i>Citrus junos</i>	유자차	-	-17.2
<i>Coix lacryma-jobi var. ma-yuen</i>	울무차	-	0.8
<i>Akebia quinata</i>	으름덩굴차	-	10.9
<i>Ginko biloba</i>	은행차	-	-
<i>Panax ginseng</i>	인삼차	-	1.8
<i>Carthamus tinctorius</i>	잇꽃차(홍화)	-	-0.3
<i>Adenophora tryphilla var. japonica</i>	잔대차	-	10.0
<i>Plantago asiatica</i>	질경이차	-	3.9
<i>Gardenia jasminoides</i>	치자차	-	-0.3
<i>Cichorium intybus L.</i>	치커리차	-	0.5
<i>Poncirus trifoliata</i>	탱자차	-	25.8
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	하늘타리차	-	-
<i>Rosa rugosa</i>	해당화차	0.8	-7.9
<i>Helianthus annus</i>	해바라기차	-	9.8
<i>Oryzae sativa</i>	현미차	-	0.4
<i>Juglans sinensis</i>	호도차	-	4.1
<i>Cucurbita moschata</i>	호박차	-	1.3
<i>Triticum aestivum</i>	우리밀차	-13.9	16.0
<i>Euryale ferox</i>	가시연밥죽(검실)	-	8.9
<i>Ipomoea batatas L.</i>	고구마죽	-	10.9
<i>Disopyrus kaki</i>	곶감죽	-	11.9
<i>Rosa laevigata Michx</i>	금앵자죽	-	26.0
<i>Daucus carota</i>	당근죽	-	-
<i>Benincasa cerifera Savi.</i>	동과죽	-	20.1
<i>Arachis hypogaea</i>	땅콩죽	-	12.9
<i>Allium sativum for. Pekinense</i>	마늘죽	-	-
<i>Paeonia suffruticosa Andrews</i>	목단피죽	-	10.9
<i>Oenanthe siolonifera</i>	미나리죽	-	43.0

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Poria cocos</i> Wolf.	백복령죽	-	12.9
<i>Saposhnikovia divaricata</i>	방풍죽	-	18.9
<i>Allium tuberosum</i>	부추죽	-	52.0
<i>Prunus armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	살구죽	-	0.8
<i>Spinacia oleracea</i> L.	시금치죽	-	0.3
<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner	연근죽	-	—
<i>Evodia officinalis</i>	오수유죽	-	-3.9
<i>Pinus koraiensis</i>	잣죽	-	19.2
<i>Sasamorpha purpurascens</i>	죽즙죽(대나무)	-	2.9
<i>Nakaki</i> var. <i>borealis</i> Nakaki		-	—
<i>Perilla sikokiana</i>	차조기죽	-	25.6
<i>Sesamum indicum</i>	참깨죽	-	—
<i>Phaseolus radiatus</i>	녹두죽	-	—
<i>Lecocasia esculenta</i> Schott.	토란죽	-	—
<i>Cuscuta japonica</i>	토사자죽	-	23.1
<i>Phaseolus angularis</i>	팥죽	-	—
<i>Polygonum multiflorum</i>	하수오죽	-	13.7
<i>Cucurbita moschata</i>	호박죽	-	17.9
<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	황정죽	-	17.6
<i>Allium fistulosum</i>	흰파죽	-	12.4
<i>Coix lacryma-jobi</i> L.var. <i>frumentacea</i> Makino	의이인죽	-	—
<i>Achyranthes ascendens</i>	Amaranth	0	14.8
<i>Allium cepa</i> L.	Onion	0	5.1
<i>Allium fistulosum</i> L.	Scallion (thick)	0	16.35
<i>Allium fistulosum</i> L.	Scallion	0	25
<i>Allium fistulosum</i> L.	Scallion (thin)	0	29
<i>Allium fistulosum</i> L.	Scallion (thin young)	0	10.8
<i>Allium monanthum</i>	Wild rocambole	0	1
<i>Allium ouensanense</i> L.		1	15.4
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic (young)	3	5.2
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic (leaf)	0	0
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic (trunk)	4	4.2
<i>Allium sativum</i> L.	Garlic	0	10
<i>Allium schoenoprasum</i>	Chives	0	35.1
<i>Allium tuberosum</i> L.	Leek (leaf)	0	13.7

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Allium tuberosum</i> L.	Leek (trunk)	0	24.1
<i>Allium tuberosum</i> L.	Leek (from China)	0	24
<i>Amaranthus mangostanus</i> L.		0	5
<i>Anethum graveolens</i> L.	Dill seed	0	2
<i>Angelica archangelica</i> L.		0	0
<i>Apium graveolens</i> L.	Celery	0	10
<i>Apium graveolens</i> L.	Celery (seed)	3	22.4
<i>Aralia elata seemann</i>	Japanese anelica tree	0	11
<i>Armoracia rusticana</i>	Horseradish	6	0
<i>Artemisia draccuculus</i>	Tarragon	4	0
<i>Artemisia vulgaris</i>	Mugwort	0	0
<i>Astar scaber</i>	Chwi	0	0
<i>Beta vulgaris</i>	Beet	0	1
<i>Beta vulgaris</i> var.	Swiss chard	0	0
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf	0	0
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf (wild type)	1	1
<i>Brassica juncea</i>	Mustard leaf	0	1
<i>Brassica alba</i>	Mustard leaf	3	11.5
<i>Brassica alba</i>	Mustard	2	4.2
<i>Brassica alba</i>	Mustard (trunk)	9	1.8
<i>Brassica oleracea</i> L. <i>botrytis</i>	Cauliflower	0	6.4
<i>Brassica oleracea</i> L. <i>capitata</i>	Cabbage	1	18.1
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>	Broccoli	10	19.3
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>	Kale	0	1
<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>	Kale (root)	0	4
<i>Brassica rapa</i>	Green vitamin (young)	0	0
<i>Brassica rapa</i>	Green vitamin	0	0
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Pickpurse	0	0
<i>Capsicum annuum</i> L.	Paprika	0	0
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper corn (pink)	0	15.2
<i>Capsicum annuum</i> L.	Pepper corn (green)	1	12.3

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper (leaf)	0	16
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper (seed)	1	23
<i>Capsicum annuum L.</i>	Green bell pepper	4	24.7
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pepper (trunk)	0	19
<i>Capsicum annuum L.</i>	Pimento (sweet pepper)	0	13
<i>Carum carvi</i>	Caraway	0	13
<i>Chilicon carne</i>	Pepper (hot)	10	13.7
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Crown daisy	1	23.8
<i>Cichorium endivia</i>	Endive	0	6.4
<i>Cicorium intybus L.</i>	Chichory (root)	11	1
<i>Cicorium intybus L.</i>	Chichory (leaf)	0	5
<i>Cicorium intybus L.</i>	Chichory (red)	0	11
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamon	0	0
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriander	0	0
<i>Coriandrum sativum L.</i>	Coriander (Mexico)	0	0
<i>Crocus sativus</i>	Saffron	0	4
<i>Cuminum cyminum</i>	Cummin	0	5
<i>Cymbopogon citrus</i>	Lemon	0	3
<i>Curcuma longa L.</i>	Turmeric	0	17
<i>Cucurbita moschate</i>	Pumpkin leaf	0	25
<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamon	0	16
<i>Eugenia caryophyllate</i>	Clove	0	11.5
<i>Eruca vesicaria</i>	Summer salad	0	14.2
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fennel	0	20.7
<i>Hemerocallis fulva</i>	Kuansh	0	24.6
<i>Illicium verum Hooker</i>	Star anis	0	13
<i>Ipomoea batatas</i>	Sweet potato	1	6.8
<i>Ixeris dentata</i>	Lettuce (green)	2	0
<i>Laurus nobilis</i>	Bay laurel	0	0
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type	7	0
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (leaf)	0	1
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (flower)	1	0
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (young)	2	0
<i>Lophanthus rugosus</i>	Wild type (old)	1	0
<i>Malva verticillate</i>	Mallow	0	10
<i>Medicago sativus</i>	Alfalfa	0	11.3

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Mentha spp</i>	Mint	0	10.4
<i>Myristica fragrans Houtt</i>	Nutmeg	0	0
<i>Myristica fragrans Houtt</i>	Mace	0	0
<i>Ocimm basilicum L.</i>	Basil	0	0
<i>Oenanthe javanica</i>	Drop wort (wild type)	0	12
<i>Oenanthe javanica</i>	Drop wort	0	16.3
<i>Origanum vulgara L.</i>	Oregano	0	12.7
<i>Papaver somniferum</i>	Poppy seed	0	15.4
<i>Paphanus acanthiformis</i>		4	18.9
<i>Perilla frutescra</i>	Perillae folium (leaf)	8	5
<i>Perilla frutescra</i>	Perillae folium (trunk)	1	31.2
<i>Perilla frutescra</i>	Perillae folium (young leaf)	3	24.3
<i>Perilla frutescra</i>	Perillae folium (green leaf)	11	18.9
<i>Petasites japonicus</i>	Butter bur	0	25.1
<i>Petroselinum crispum</i>	Italian seasoning	0	0
<i>Petroselinum crispum</i>	Parsley (leaf)	0	0
<i>Petroselinum crispum</i>	Parsley	0	1
<i>Physalis francheti</i>	Green young pepper	0	10
<i>Pimenta dioicalis</i>	Allspice	0	12.4
<i>Pimpinella anisum</i>	Anise	4	19.7
<i>Pimpinella brachycarpa</i>	Young	5	18.3
<i>Pimpinella brachycarpa</i>		11	11.5
<i>Pipper nigrum L.</i>	Pepper (black)	5	10.8
<i>Pipper nigrum L.</i>	Pepper (white)	1	1
<i>Raphanus sativus</i>	Raddish	4	0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosemary	0	0
<i>Salvia officinalis</i>	Sage	0	0
<i>Sedum sarmentosum</i>	Stringy stone crop	0	10.2
<i>Sinapis alba L.</i>	Mustard	0	11.8
<i>Taraxacum officinale L.</i>	Dandelion	0	22.4
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	0	33.1
<i>Trigonella foenugraecum</i>	Fenugreek	5	25.2

(continued)

Scientific name	Common name	Fr. 1	Fr. 3
<i>Valerianella locusta</i>	Corn salad	0	16.8
<i>Vilola diamantica</i>	Butter bur leaf	11	13.2
<i>Wasabia japonica</i>	Wasabia	0	5
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Japanese pepper	0	1
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	0	17.8
<i>Petasites japonicus</i>	Butter bur	0	15.6
<i>Petroselinum crispum</i>	Italian seasoning	0	7.4

\* ChAT activity (%): The percentage of enzyme activity value for each sample was calculated with the control activity (100%). The final concentration of each sample in assay mixture was 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### 나. 선정된 choline acetyltransferase활성 물질의 *in vivo*상의 독성실험

대추(*Zizyphus jujuba*) 대한 methanol 희분을 농도별(0, 100, 500, 1500 mg/kg)로 하여 독성 실험을 실시한 결과 급성독성 실험 전·후의 body weight에서 비정상적인 변화는 발견되지 않았다. 특히 농도에 관계없이 각 group의 모든 mouse의 생존율이 100%였고, serum의 GPT (glutamic pyruvate transaminase), GOT (glutamic oxaloacetate transaminase) 변화도 SAS analysis 결과 유의성을 보이지 않음으로서 선정된 sample의 독성은 없는 것으로 확인되었다 (Table 3-2-3, 4, 5).

**Table 3-2-3. Body weight and survival rate of mice orally administrated *Zizyphus jujuba* on acute toxicity.**

Group	No. of mice	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	No. of mice survived	Survival rate (%)
Control	10	30	31.2 $\pm$ 2.5	10	100
100 mg/kg	10	30	32.0 $\pm$ 2.7	10	100
500 mg/kg	10	30	33.0 $\pm$ 2.7	10	100
1,500 mg/kg	10	26.0 $\pm$ 5.4	31.3 $\pm$ 2.5	10	100

**Table 3-2-4. Effect of *Zyziphus jujuba* methanolic extract on GPT in ICR mouse for 10 days.**

GPT (glutamate pyruvate transaminase)	
Control	3.95 ± 1.20 <sup>1)a</sup>
100 mg/kg	2.90 ± 0.43 <sup>a</sup>
500 mg/kg	3.32 ± 0.64 <sup>a</sup>
1,500 mg/kg	3.11 ± 0.54 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Values represent the means (n=3) ± S.D.

<sup>a)</sup>Duncan's multiple range tests of SAS (statistical analysis system) showed no difference (P<0.05).

**Table 3-2-5. Effect of *Zyziphus jujuba* methanolic extract on GOT in ICR mouse for 10 days**

GOT (glutamate oxaloacetate transaminase)	
Control	517.4 ± 181.0 <sup>1)a</sup>
100 mg/kg	421.1 ± 161.0 <sup>a</sup>
500 mg/kg	515.9 ± 292.2 <sup>a</sup>
1,500 mg/kg	326.9 ± 180.6 <sup>a</sup>

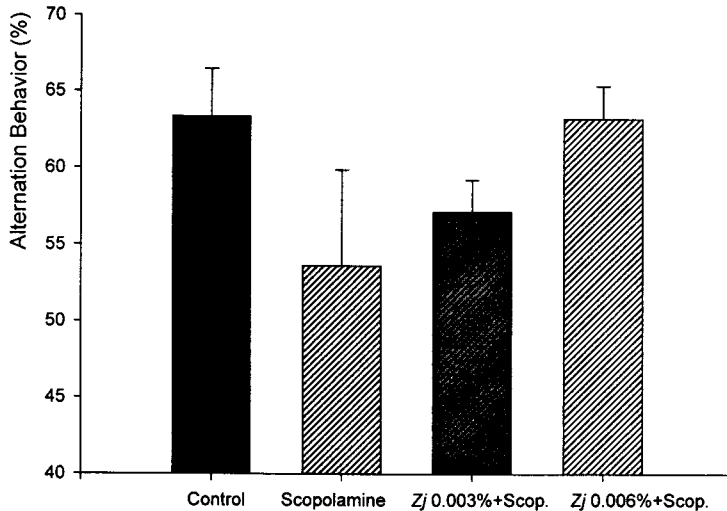
<sup>1)</sup>Values represent the means (n=3) ± S.D.

<sup>a)</sup>Duncan's multiple range tests of SAS (statistical analysis system) showed no difference (P<0.05).

#### 다. 선정된 Choline acetyltransferase 활성물질의 *in vivo* 행동 실험

##### 1) Y-maze test

Scopolamine group은 sample을 전혀 먹이지 않은 group에 scopolamine을 주사한 것이고, 나머지는 sample을 각각의 농도 (0.003, 0.006%)로 투여하였던 group에 scopolamine을 주사하여 실험을 실시한 것이다. Scopolamine을 주사하지 않은 control group의 brain 활성을 100%로 보았을 때, scopolamine group은 84%로서 약 16%의 저해를 보였다. 반 면 대추 sample을 각각 0.003, 0.006%를 pretreatment한 group들은 89%, 99%의 brain 활성을 보였다. 즉 scopolamine의 저해효과를 억제하였으며 0.006%를 투여한 group은 control 만큼 약물의 저해효과를 회복/예방하였음을 확인하였다 (Fig. 3-2-4).

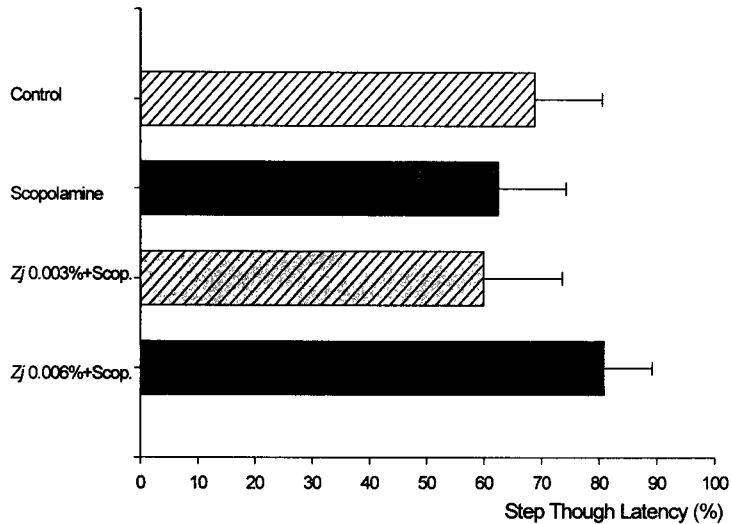


**Fig. 3-2-4. Protective effect of *Zyzyphus jujuba* on the scopolamine-induced impairment in learning and memory in mice.** After injection (1 mg/kg), each behavioral test was performed. The data are presented as means  $\pm$  S.E. mean (n=10). Control mice were injected with 0.85 % (w/v) saline (100  $\mu$ l).

## 2) Passive avoidance test

다음의 농도 (0.003, 0.006%)로 투여하였던 group에 scopolamine을 주사하여 실험을 실시하였다. Scopolamine을 주사하지 않은 control group의 인지 및 학습능력을 100%으로 보았을 때, scopolamine group은 73%로서 약 27%의 인지 및 학습능력 저해를 보였다. 대추 sample을 각각 0.003, 0.006%를 pre-treatment한 group들은 78%, 89%의 인지 및 학습능력을 보임으로써 5%와 16%의 약물 저해 억제효과를 보였다. 즉 scopolamine의 인지 및 학습능력저하 효과는 대추sample의 pre-treatment로 상당부분 억제/회복되었다 (Fig. 3-2-5).



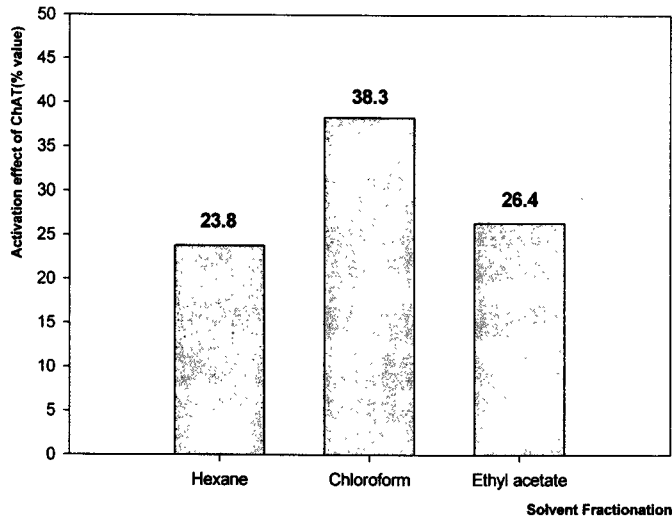


**Fig 3-2-5. Protective effect of *Zyzyphus jujuba* on the scopolamine (SCOP)-induced impairment in learning and memory in mice.** After injection (1 mg/kg), each behavioral test was performed as shown in Figure 2. Mice were trained on a one-trial step-through passive avoidance task. The testing trial was given 1 day after the training trial. The data are presented as means  $\pm$ S.E. mean (n=10). Control mice were injected with 0.85 % (w/v) saline (100  $\mu$ l). \*  $P < 0.05$  vs saline-treated control.

## 라. 선정된 choline acetyltransferase activator의 정제

### 1) 대추에서의 활성 물질의 탐색을 위한 1차 물질 분리

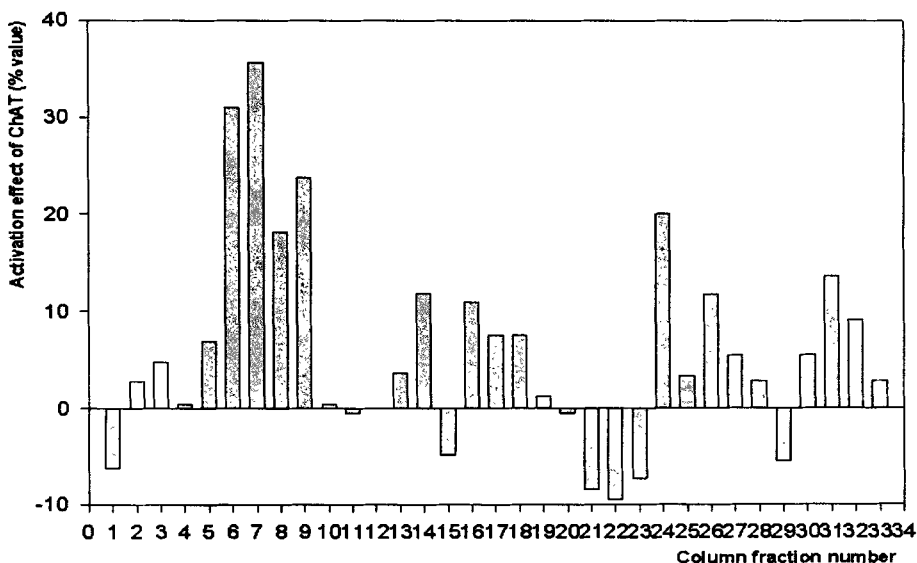
선정된 대추의 crude methanolic extract를 극성도에 따라 분획한 다음 각 분획의 ChAT에 대한 효소 활성을 검색하였다. Hexane, chloroform, ethyl acetate의 순으로 분획한 결과 chloroform layer에서 38.3 %의 유의적인 ChAT activation을 보였다 (Fig. 3-2-6).



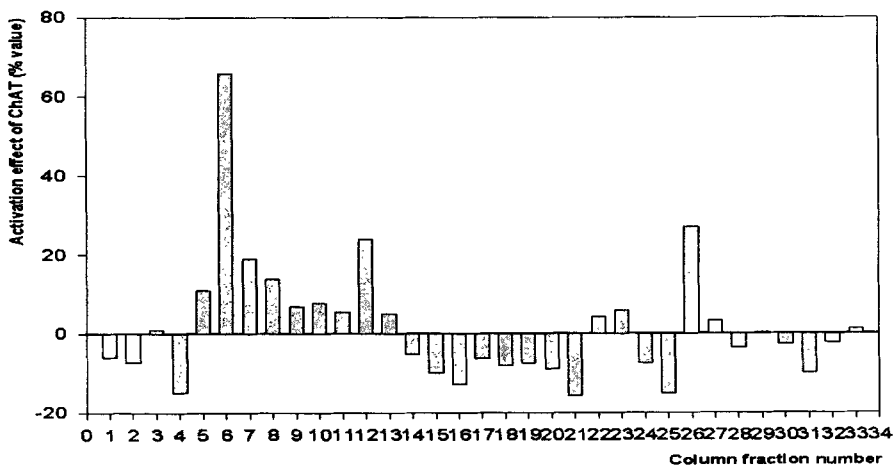
**Fig. 3-2-6. Activation effect on ChAT of *Zizyphus jujuba* fractionated by the solvent partitioning.** The percentage of enzyme activity values for solvent fractionation was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 170  $\mu\text{g/ml}$ .

## 2) Silica-gel open column chromatography에 의한 *Zizyphus jujuba* methanol 추출물의 ChAT 활성

Active component를 찾기 위해서 first silica gel open column을 걸어 33개의 fractions를 얻었다 (Fig. 3-2-7). 이 중에서 chloroform과 methanol의 비율이 90:10의 3번째(6번) fraction과 80:20의 1-3(7-9번)번째 fractions에서 평균 27.2 %의 유의적인 activity를 보였다. 이 4개의 fractions를 대상으로 한 second silica gel open column에서 chloroform:methanol=90:10 fraction에서 65.7 %의 activation effect를 확인하였다 (Fig. 3-2-8).



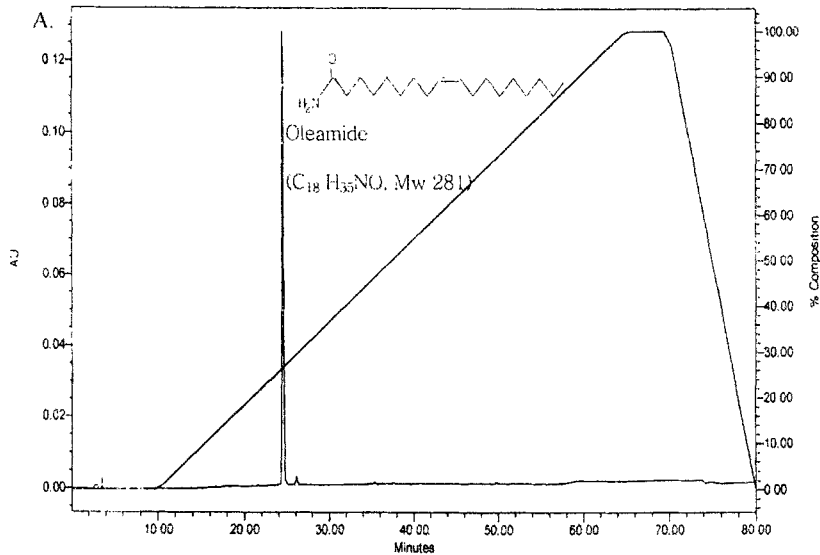
**Fig. 3-2-7.** Activation effect on ChAT activities of *Zizyphus jujuba* fractionated by the first silica gel open column chromatography. The percentage of enzyme activity values for each fraction was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 170  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Eluant was mixture of  $\text{CHCl}_3$  and MeOH (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)



**Fig. 3-2-8.** Activation effect on ChAT activities of *Zizyphus jujuba* fractionated by the second silica gel open column chromatography. The percentage of enzyme activity values for each fraction was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Eluant was mixture of  $\text{CHCl}_3$  and MeOH. (100:0, 90:10, 88:12, 85:15, 83:17, 80:20, 78:22, 75:25, 73:27, 70:30, 0:100)

### 3) HPLC에 의한 *Zizyphus jujuba* methanol 추출물의 활성 물질 분리

Waters 2690 HPLC에서 PDA detector와 C<sub>18</sub> reverse column을 사용하였으며 UV detector로 흡광도 360 nm에서 peak을 확인하였다 (Fig. 3-2-9).



**Fig. 3-2-9 Gradient reversed phase HPLC analysis of ChAT activator from *Zizyphus jujuba*.** ( $\mu$ -bondapack C<sub>18</sub> reverse column: 7.8300 mm, mobile phase, 80 min gradient of 0-100% methanol in water, flow rate, 3.0 ml/min: UV detector, absorbance monitor at 360 nm. Injection volume was 20  $\mu$ l)

## 제 3 절 외인성 피부노화 제어 미량소재의 실용화

### 1. 서설

피부는 신체기관 중 가장 큰 부위를 차지하며, 주변 환경에 대응하여 보호, 체온조절, 배설, 면역기능 등 다양한 역할을 수행하고 있다. 피부의 노화는 시간의 흐름에 따른 생리적 노화 (chronologic aging) 과정과 외재적 요인에 의한 노화 (extrinsic aging) 과정으로 나누어진다. 피부노화에 영향을 미치는 외부인자들은 바람, 온도, 습도, 담배연기, 공해, 자외선 등에 의해서 노화가 일어나며 특히 자외선에 의한 노화를 광노화라고 한다. 태양광선은 크게 감마선, X선, 자외선, 가시광선, 적외선으로 나눌 수 있으며 이중 자외선 (ultraviolet radiation, UV)은 파장에 따라 자외선 A (UVA, 320~400 nm), 자외선 B (UVB, 290~320 nm), 자외선 C(UVC, 200~290 nm)로 나뉘어 지며, 이중 자외선 B가 광노화의 주요 요인으로 보고되었다. 광노화로 인해 피부는 깊은 주름, 색소침착, 거칠음, 탄력 저하 등과 같은 변화가 진피층의 구조 및 조성의 변화와 함께 나타나게 된다. 태양광으로부터 발생하는 UV (ultraviolet radiation)는 피부세포 특히, 표피와 진피 세포의 DNA와 피부 진피층의 90%를 차지하는 collagen 단백질을 손상시키는 것으로 밝혀져 있다. DNA의 손상은 피부암을 유발시키는 요인으로 추측되고 있으며, collagen 단백질의 붕괴는 피부의 탄력과 강도를 감소시켜 피부노화를 일으키는 광노화 (photoaging)의 주기작으로 알려져 있다.

고령화 인구가 증가하면서 피부에 대한 관심도 점차 증대되고 있으나 국내의 경우 의과, 약학대학에서 주로 염증과 피부 창상에 대한 상처 치료분야를 연구하고 있을 뿐 광노화의 기전과 항피부노화 생리활성물질에 대한 연구는 극히 미미한 실정에 있다. 뿐만 아니라 피부노화 연구는 실험재료의 채취하기가 쉽고 시료 채취 후에도 계속적으로 노화현상에 대한 연구를 수행할 수 있어 향후 인체 노화연구의 대표적 model이 될 가능성이 높다. 만성적 일광손상을 입은 피부에서 볼 수 있는 현상은 진피의 상부쪽 교원질의 비정상적인 elastotic material의 침착 (solar elastosis)과 proteoglycan이 증가되고 진피의 주 단백질인 콜라겐이 현저히 감소되는 것이다. 일반적으로 진피층은 대부분 type I collagen과 약간의 type III collagen, elastin, proteoglycan, fibronectin 등으로 구성되어 있다. 또한 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여하며 이로 인해 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층 구성단백질의 90%를 차지하고 있어 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다. 피부 광노화에 대한 기전은 국내외적으로 아직 규명된 바 없으며 현재는 미시건 대학의 Gary J. Fisher의 학설이 가장 주목을 받고 있다. 이 설은 UV에 의해 자극된 피부의

각질세포나 섬유아세포 표면의 growth factor 및 cytokine receptor가 여러 단계의 protein kinase cascade를 통한 signal transduction 과정을 거치면서 세포핵에 위치한 transcription factor인 AP-1을 자극, MMP(matrix metalloproteinase)의 전사를 촉진시킴으로써 최종적으로 진피층의 collagen과 다른 구성요소들이 붕괴되어 노화를 일으킨다는 이론이다. UV는 활성산소의 형성도 함께 유도하며 형성된 활성산소종은 다시 광노화의 기전과도 밀접하게 관련되어 있음이 보고되어 있다. 독일 Dr. Fusenig에 의한 HaCaT cell line (피부표피세포주)의 개발 이후 이 세포주를 이용한 피부의 연구가 signal transduction, MMP(matrix metalloproteinase), 활성산소종 등에 초점을 맞춰 활발히 진행 중에 있다. 국내의 경우는 retinoic acid를 비롯해 주름형성을 막거나 개선시켜주는 물질에 대한 연구가 몇몇 화장품업체 및 소수의 대학에서 진행 중에 있으나 광노화 기전 및 광노화로부터 피부 보호물질 또는 광노화 억제물질에 대한 연구는 거의 진행되고 있지 않은 실정이다.

MMP (matrix metalloproteinase)는 ECM (extracellular matrix, 세포외기질)과 BM (basement membrane, 기저막)의 분해에 관여하는 여러 효소의 family로 구조와 기능적 특성에 따라 interstitial collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type MMP(MT-MMP) 등 네개의 subfamily로 나누어진다. MMP는 활성중심부에 아연을 가지는 금속단백분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen)형태로 분비된다. 효소활성을 가지기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단, 활성화되며 활성화된 MMP는 2-macroglobulin이나 TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinase)같은 저해제에 의해 활성이 조절되고 피부의 keratinocyte, fibroblast를 포함한 대다수의 많은 세포들이 MMP를 분비한다. Fisher 등은 1회의 UV 조사에도 피부내의 MMP활성이 증가되며 피부내 콜라겐을 현저하게 붕괴시킴으로써 MMP들이 진피층의 콜라겐 붕괴에 영향을 미치며 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다.

두충 (Eucommia Cortex)은 식물분류상 두충과 (Eucommia)에 속하는 낙엽교목으로 *Eucommia ulmoides* Olive의 껍질을 건조시킨 것으로 원산지는 중국 중서부이다. 15년 이상된 두충 수피만을 약용으로 이용하며, 그 기미(氣味)는 신온 무독 (辛溫無毒)하고, 표면은 회갈색으로 꺼칠꺼칠하고, 안쪽은 어두운 자색으로 매끈매끈하다. 두충 수피는 고대 중국에서부터 한방 약재로 사용되어 왔으며, 고혈압, 진통, 신경통, 유산예방, 콜레스테롤저하 작용 등이 밝혀져 있으며, 본초강목에 따르면 신장과 간장에 작용하여 허리, 무릎 통증을 완화시키고, 근육과 뼈를 튼튼하게 하고 잔뇨를 없애며 몸을 가볍게 하고 노화를 방지한다고 알려져 있으나, 두충추출물 자체가 진피세포의 MMP-1 합성억제제로 탁월한 효과가 있음이 보고되어진 바는 없다.

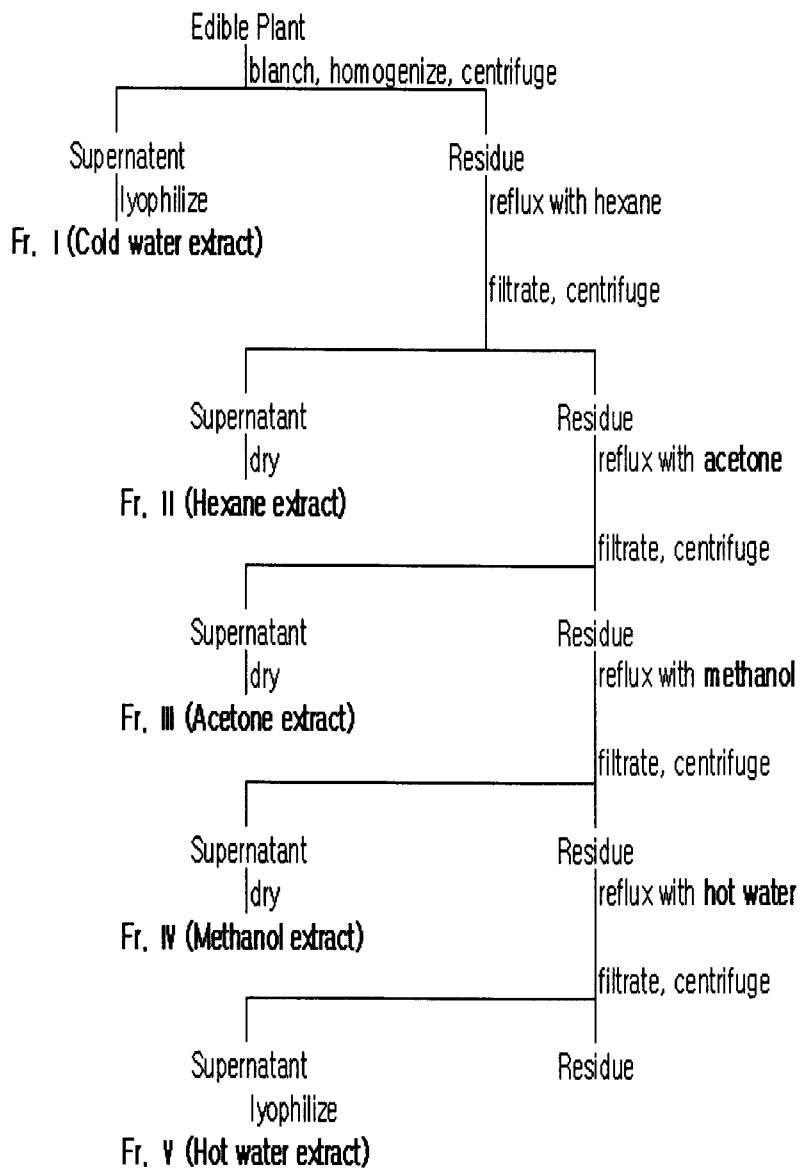
우리 국민들은 전통적으로 차, 채소류를 비롯한 각종 식·약용 식물들을 즐겨 섭취해 왔을 뿐만 아니라 이들의 약리, 생리활성에 대한 많은 구전과 보고들이 있어 왔다. 따라서 식·약용 생물자원에 함유된 유효 성분에 관한 연구는 향후에도 활발히 진행될 것이며, 특히 이 분야 연구는 타 생물소재에 비하여 비교적 미개척 분야로 특이한 구조와 기능을 가진 신규화합물이 발견될 가능성이 높다. 생리, 약리활성을 함유한 식·약용 식물 추출물의 산업적 응용은 정제도에 따라 의약품으로부터 기능성 식품 및 화장품에까지 다양한 형태를 취할 수 있기 때문에 산업화가 용이한 장점을 가지고 있기도 하다. 본 연구과제에서는 국내산 식·약용 생물자원 약 60여종을 대상으로 UVB에 의한 피부노화를 제어할 수 있는 물질을 탐색하고 이 성분을 기능성식품 또는 화장품의 원료로 소재화하는데 그 목적을 두고 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 재료

본 실험에서 사용된 60여종의 국내산 식·약용 생물자원은 서울 시내 백화점, 경동시장, 수협 등지에서 산지가 표시된 것만을 구입 또는 제공받아 사용하였다. 최종 선별된 시료인 두충(*Eucommia ulmoides*)은 경동시장에서 건조된 상태로 구입하여 자연건조 후, 다단계의 대량추출 과정을 거쳐 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 진피세포인 HS68 Human foreskin fibroblast cell line(CRL 1635)은 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양받았으며, DMEM(Dulbecco's modified eagle medium), FBS(fetal bovine serum), antibiotics 등은 Gibco-BRL사 (Grand Island, USA), sodium bicarbonate는 Sigma사로부터 구입하였다. MMP-1과 MMP-2 antibody는 Oncogen research product (MA, USA), Anti-mouse IgG, TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide), DMSO(dimethyl sulfoxide) 등은 Sigma사 (St. Louis, USA) 제품, aucubin은 Wako사 (Osaka, Japan) 제품을, 그 외의 시약은 시약 일급 또는 특급을 사용하였다.

독성 실험에서 사용된 동물은 6~7주령의 SPF, ICR 계 수컷 mouse로 대한실험동물에서 분양받아 사용하였으며, 실험동물은 온도 22±2℃, 습도 55~60%에서 1일 12시간씩 점등 하에, 물과 사료를 자유로이 급식시키면서 사육하였다.



Scheme 3-3-1. Flow sheet for systematic extraction from various edible plants.



## 나. 실험 방법

### 1) MMP-1 억제활성물질 검색용 시료의 조제

각각의 시료는 Scheme 4-1의 방법에 따라 100℃에서 5분간 blanching하여 생 세포내 효소를 불활성시키고 동결건조하여 수분을 완전히 제거하였다. 중량을 확인한 시료에 적당량의 증류수를 넣고 5,000 rpm에서 5분, 6,000 rpm에서 5분, 7,000 rpm에서 20분간 homogenizer (IKA Labortechnik Co. Ultra-turrex T50, Germany)로 파쇄한 후 5,000 × g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 냉수추출 획분 (Fr. I)으로 하였다. 침전물은 동결건조하여 수분을 완전히 제거한 다음, 극성도에 따라 hexane, acetone, methanol, hot water 순으로 2 시간 동안 환류 추출한 후 각각을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III, IV, V의 용매별 추출획분을 조제하였다.

### 2) MMP-1 및 MMP-2 억제활성 assay계

MMP-1 억제활성능의 측정은 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법에 근거하여 조건을 검토한 후 다음과 같은 assay계를 확립한 후 측정하였다 (Scheme 3-3-2). HS68 cell line을  $6 \times 10^4$  cells/well 농도로 12 well-plate에 배양, 약 80% confluency에 도달할 때 원배지를 제거한 후, PBS로 세척하고 serum free DMEM과 시료를 0.1 mg/ml이 되도록 함께 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% humid air condition에서 20시간 동안 반응시켰다. 반응 후 소량의 PBS를 첨가하여 cell이 잠긴 상태에서 UVB를 조사하였으며 대조구는 UV를 조사시키지 않고 형광등 아래에서 동일한 시간을 방치시킨 다음 serum free DMEM을 첨가하여 48시간 배양한 후 상등액을 취하여 MMP-1의 농도를 ELISA 방법을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, immuno-well plate에 glutaraldehyde를 100  $\mu$ l (10  $\mu$ l /ml D.W)씩 well에 분주하여 37℃, 1시간 반응시킨 후 증류수로 well-plate를 세척하고 물기를 제거하였다. 상기의 배양 상등액을 100  $\mu$ l 분주하고 37℃, 1시간 반응시킨 후 MMP-1 antibody (mouse)를 1 : 1,000으로 washing solution (0.5% Tween 20 in PBS)에 희석하여 100  $\mu$ l 씩 분주하고 37℃, 1시간 반응시켰다. Anti-mouse IgG peroxidase conjugated를 1 : 30,000으로 washing solution에 희석하여 37℃, 1시간 반응시킨 후 기질[TMB 10 mg/mL DMSO, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.1)]을 well당 200  $\mu$ l 씩 넣어 15 분간 빛을 차단하여 반응시켰다. 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 완전히 중지시킨 후 micro plate reader (Model 550, BIO-RAD Laboratories, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 의한 MMP-1 억제활성은 아래 식에 따라 환산하였다. MMP-2 또한 MMP-2 antibody를 사용하여 동일한 방법으로 측정하였다.

$$\text{Inhibitory activity of MMP-1 secretion (\%)} = \left[ 1 - \frac{As - Ac}{Ab - Ac} \right] \times 100$$

Ac : 형광등 조사 대조구 medium의 흡광도

Ab : UVB를 조사하고 sample 처리하지 않은 medium의 흡광도

As : UVB를 조사하고 sample 처리한 medium의 흡광도

### 3) Cell viability의 측정

MMP 량 측정에 미치는 세포 농도의 영향을 보정해 주기 위해 MTT assay를 다음과 같이 실시하였다. 배양이 완료된 배지의 10%에 해당하는 MTT 용액을 넣고 3시간 37°C에서 빛을 차단한 채 반응시킨 다음 형성된 formazan을 DMSO로 녹인 후 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) 선정시료 두층의 메탄올 추출 및 유기용매 분획

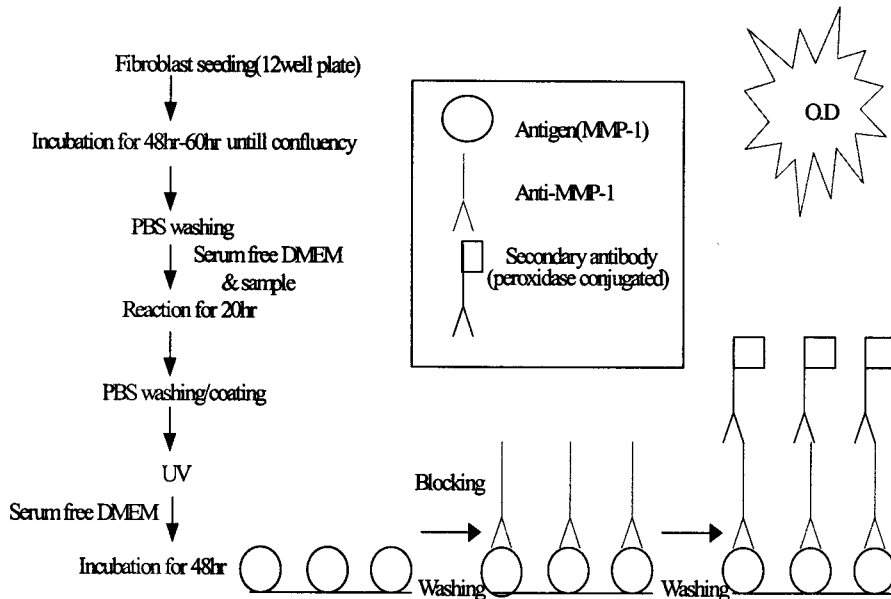
대량으로 구입한 두층을 100°C에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성화시키고, hand mixer로 곱게 마쇄한 후 2 kg의 두층 조말을 methanol 5배 부피로 2주 동안 정치시키면서 4회 추출한 후 감압농축하여 두층 methanol 추출물을 조제하였다. 추출물로부터 methanol을 완전히 제거한 후 hexane, chloroform, ethylacetate를 각각 5배 부피로 환류 추출함으로써 각 유기용매별 가용획분을 조제하였다 (Scheme 3-3-3).

### 5) 선정시료의 항산화 활성 검토

두층 methanol 추출물의 superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot -}$ ) 소거활성 측정은 Philip C. 등의 LDH-NADH oxidation system을 이용한 방법으로 측정하였으며, malondialdehyde(MDA)양의 측정은 MDA가 thiobarbituric acid와 반응할 때 나타나는 붉은색을 535 nm에서 측정하는 thiobarbituric acid assay 방법을 이용, 분자 흡광계수  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 사용하여 계산하였다.

### 6) MMP-1 억제활성물질의 *in vivo* 독성 실험

선정된 두층 methanol 추출물의 급성독성 여부를 확인하기 위하여 ICR mouse를 이용하여 시료를 0, 500, 1,000, 1,500 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 mouse에 음용수의 형태로 3주 동안 공급하였다. 3주 동안의 체중변화를 관찰하고 최종일까지 생존한 마리 수를 측정 후 백분율로 표시하였다.



Scheme 3-4-2. Assay system for determining inhibitory activity of MMP-1 secretion induced by UVB.

7) 두 층으로부터 MMP-1 억제 활성물질의 분리 및 구조동정

가) Silica gel 60 open column chromatography

MMP-1에 대해 높은 억제 활성을 보인 methanol 분획의 silica gel 60 open column chromatography는 다음과 같이 실시하였다. Chloroform으로 활성화된 silica gel 60 column(6 cm × 31 cm)에 시료를 loading하고 chloroform과 methanol의 비율을 100 : 0에서 0 : 100으로 10%씩 변화시키면서 stepwise로 각각 5 bed volume씩 전개하면서 1차적으로 MMP-1 억제 활성을 갖는 분획을 분리한 후, 이를 농축하여 동일한 방법으로 2차 silica gel 60 open column chromatography(1.3 cm × 28 cm)를 실시하여 chloroform과 methanol의 비율을 100:0, 80:20, 55:45, 40:60, 37:63, 35:65, 32:68, 30:70, 27:73, 25:75, 22:78, 20:80, 15:85, 0:100로 변화시키면서 5 bed volume씩 용출하여 가장 높은 MMP-1 억제 활성을 나타내는 분획을 분리하였다.

#### 나) Prep-TLC

상기 Silica gel 60 column chromatography로 분리된 억제활성 분획을 ODS gel plate(20 cm × 10 cm)에서 isopropanol : water = 3 : 2의 전개용매로 Prep-TLC (Thin layer chromatography)를 실시하여 5개의 획분으로 분리하였다.

#### 다) Prep-HPLC

Prep-TLC로부터 분리된 활성획분을 HPLC (u-Bondapak C<sub>18</sub>, 7.8 mm × 300 mm)에 주입하고 물과 methanol을 사용하여 H<sub>2</sub>O : MeOH = 100 : 0에서 0 : 100의 linear gradient 용출조건과 3 ml/min의 유속으로 분리하여 활성획분만을 농축하였다.

#### 라) Analytical HPLC

상기의 활성획분을 u-Bondapak C<sub>18</sub> (3.9 mm × 150 mm) column을 사용하여 물 : acetonitrile = 97 : 3 용매조건으로 analytical HPLC를 실시하여 MMP-1 억제활성물질을 정제하였다.

#### 마) 두충 함유 MMP-1 억제활성물질의 구조분석 및 동정

HPLC로 분리된 MMP-1 합성억제 peak를 농축한 후 <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TeslaAvance-500, Bruker, German)을 이용하여 시료의 이화학적 이동 (ppm)을 측정, 구조분석하고 chemicals library로부터 물질을 동정하였다.

### 3. 결과

#### 가. 식·약용 식물로부터 MMP-1 억제활성물질의 검색

##### 1) 식·약용 식물로부터 MMP-1 억제활성물질의 1차 검색

국내산 식·약용 식물로부터 외인성 피부노화 제어 미량소재를 실용화시키기 위해 앞서 기술한 방법에 따라 조제한 추출물 160여점을 대상으로 assay계 최종 농도 0.1 mg/ml에서 HS68 cell line을 이용한 ELISA assay system으로 MMP-1 억제활성물질을 검색한 결과는 Table 4-1, 4-2, 4-3과 같다. 냉수 추출물 (Fr. I)에서는 흰과, 아가위, 마늘, 땅콩 등이, methanol 추출물 (Fr. IV)에서는 당귀, 구기자, 질경이, 래디쉬, 두충 등이, 열수 추출물 (Fr. V)에서는 대추, 질경이 등이 대조군보다 높은 MMP-1 억제활성을 나타내었다.

##### 2) MMP-1 억제활성물질의 2차 검색

시료의 산지별, 계절별, 품종별 활성변화에 의한 시료선정의 정확성을 기할 목적으로 1차 활성검색시 높은 MMP-1 억제활성을 나타내었던 후보원료들인 당귀, 구기자, 래디쉬, 두충을 대량 구입한 후 이들의 methanol 추출물을 대상으로 ELISA assay system을 이용한 2차 활성검색을 실시한 결과 두충의 methanol

추출물이 가장 높은 억제활성을 나타냄으로써 두충을 시료로 선정하였다 (Table 3-3-4).

### 3) 선정된 두충 methanol 추출물의 *in vivo* 독성 실험

상기에서 시료로 선정된 두충 methanol 추출물의 급성독성 여부를 알아보기 위해 추출물을 0, 500, 1,000, 1,500 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 ICR mouse에 음용수의 형태로 3주 동안 공급해 주면서 생존율을 검토한 결과, 모든 군에서 100%의 생존율을 보임으로써 두충 추출물에 의한 독성은 나타나지 않았다(Table 3-3-5). 따라서 두충의 methanol 추출물을 본 연구과제의 최종 시료로 선정하였다.

Table 3-3-1. First screening for inhibitory effect of MMP-1 secretion of fractions extracted from plants for tea and rice paste

Samples	Scientific name	Korean name	Inhibitory effect of MMP-1 secretion(%)		
			Fr.1	Fr.4	Fr.5
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	감초	0	2	64
	<i>Glycine max</i>	검정콩	2	11	0
	<i>Cassia tora</i>	결명자	17	0	0
	<i>Cinnamomum loureirii</i>	계피	2	40	77
	<i>Citrus unshiu</i>	귤피	35	2	0
	<i>Capsella bursa-Pastoris</i>	냉이	5	17	11
	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	대추	32	48	94
	<i>Condonosis lanceolata</i>	더덕	21	75	44
	<i>Platycodon grandiflorum</i>	도라지	55	34	43
	<i>Polygonatum japonicum</i>	둥글레(앞)	2	0	0
	<i>Astragalus membranaceus</i>	황기	31	16	69
	<i>Psseudoctdonia sinensis</i>	모과	0	7	0
	<i>Taraxacum platycarpum</i>	민들레	11	0	47
	<i>Menta arvensis</i> var. <i>japonica</i>	박하	3	0	0
	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill. <i>saboten</i> Makino	백년초	13	0	68
	<i>Phaseolus angularis</i>	팥	0	43	0
	<i>Polygonum multiflorum</i>	하수오	40	65	26
	<i>Cucurbita moschata</i>	호박	8	32	0
	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red.	황정	8	0	0
	<i>Allium fistulosum</i>	흰파	79	42	22
	<i>Chrysanthemum motifolium</i>	들국화	17	0	0
	<i>Zingiber officinale</i>	생강	0	3	9
	<i>Cuscuta japonica</i>	토사자	0	0	70
	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i>	들깨	0	7	51
	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	오가피	11	31	0
	<i>Schizandara chinensis</i>	오미자	2	48	74
	<i>Zea mays</i>	옥수수	49	15	63
	<i>Akebia quinata</i>	으름덩굴	3	0	0
	<i>Hemerocallis fluva</i>	원추리	3	3	73
	<i>Carthamus tinctorius</i>	홍화	21	5	8
	<i>Adenophora tryphilla</i> var. <i>japonica</i>	잔대	5	1	13
	<i>Brassica alba</i>	겨자잎	3	0	62
	<i>Rosa laevigata</i> Michx.	금앵자	0	14	12
	<i>Arachis hypogaea</i>	땅콩	81	0	21
	<i>Allium sativum</i> for. <i>Pekinense</i>	마늘	87	7	48

Samples	Scientific name	Korean name	Inhibitory effect of MMP-1 secretion(%)		
			Fr.1	Fr.4	Fr.5
	<i>Diospyros kaki</i>	감잎	3	10	23
	<i>Lycium chinense</i>	구기자	51	36	35
	<i>Cinamomum camphora</i>	녹차	0	0	0
	<i>Angelica gigas</i>	당귀	13	6	48
	<i>Eucommia ulmoides</i>	두충껍질	43	85	59
	<i>Eucommia ulmoides</i>	두충잎	45	0	0
	<i>Hordeum Vulgare L.</i>	보리차	47	42	22
	<i>Rubi fructus</i>	복분자	0	0	0
	<i>Punica graatum</i>	석류	25	0	0
	<i>Artemisia asiatica</i>	쑥	0	0	0
	<i>Crataegus pinnatifida Bunge</i>	아가위	62	101	78
	<i>Pinus aristata</i>	잣	0	39	0
	<i>Plantago asiatica</i>	질경이옆매	0	48	0
	<i>Plantago asiatica</i>	질경이잎	43	0	20
	<i>Gardenia jasminoides</i>	치자	7	34	32
	-	쌍화차	0	0	0
	<i>Astragalus membranaceus</i>	황기	31	16	69
	<i>Polygonatum japonicum</i>	둥글레(줄기)	2	28	51
	<i>Zanthoxylum schinifolium SIEB. et Zucc</i>	천초	0	14	15
	-	용안육	0	17	42
	<i>Pruns mune SIEB, et Zucc</i>	매실	0	0	81
	<i>Petasites japonicus(Sieb. et Zucc)</i>	관동화	0	2	90
	<i>Maxim</i>				
	<i>Polygonatum odoratum(MILLER)</i>	황정	8	32	0
	<i>DRUCEvar.pluriflorum(MIQUEL) OHWI</i>				
	<i>Disopyrus kaki</i>	곶감	19	0	0
	<i>Pimpinella frutescra</i>	들깨잎	6	0	3
	<i>Rosa rugosa</i>	해당화	6	0	0
	<i>Cichorium intybus L.</i>	치커리	3	12	11
	<i>Helianthus annus</i>	해바라기	2	0	0
	<i>Lophanthus rugosus</i>	방아꽃	0	5	9

Table 3-3-2. First screening for inhibitory effect of MMP-1 secretion of fractions extracted from spices plants

Samples	Scientific name	Korean name	Inhibitory effect of MMP-1 secretion(%)		
			Fr.1	Fr.4	Fr.5
	<i>Valerianella locusta</i>	콘샐러드	0	17	13
	<i>Brassica Juncea</i>	갓	0	46	71
	<i>Ma lva verticillata</i>	아욱	0	0	0
	<i>Brassica oleracea</i>	브로커리	0	0	18
	<i>Cichorium endivia</i>	앤다이브	0	28	0
	<i>Brassica oleracea</i>	커리플라워	0	1	52
	<i>Medicago sativa</i> L.	알파파	0	0	0
	<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne	마	0	23	28
	<i>Brassica campestris</i> var.chinensis	백경채	0	0	38
	<i>Impomoea Batatas</i>	고구마	0	49	80
	<i>Petroselinum crispum</i>	잎파세리	0	0	85
	<i>Pimpinella brachycarpa</i> NAKIA	어린참나물	0	0	19
	-	고나	0	0	31
	<i>Brassica juncea</i> L.	겨자채	0	0	62
	<i>Perilla Frutescens</i> Britton	청들깨잎	3	0	0
	<i>Cichorium intybus</i> L.	치커리뿌리	0	0	0
	<i>Thymus vulgaris</i>	백리향	0	6	73
	<i>Brassica oleracea</i>	케일뿌리	0	0	0
	<i>Raphanus sativus</i>	래디쉬	46	86	0
	-	왕궁야채	0	0	62
	<i>Lohpanthus rugosus</i>	방아잎	0	0	0
	-	그린비타민	0	0	68
	-	젠트	0	0	85
	<i>Althaea rosea</i>	접시꽃	0	0	51
	<i>Bctavulgaris</i> L.	이태리근대	0	0	0
	-	스파이스	0	90	71
	-	장노희	0	0	36
	<i>Brassica campestris</i> var.chinensis	청경채	0	65	10
	<i>Paphanus acanthiformis</i>	무순	0	23	63
	<i>Moutan radidis</i>	목단피	23	3	0
	<i>Oenanthe siolonifera</i>	미나리	66	5	7
	<i>Poria cocos</i> Wolf.	백복령	0	49	28
	<i>Allium tuberosum</i>	부추	0	23	0
	<i>Prunus armeniaca</i> var. ansu	살구	0	36	0
	<i>Nelumbo nucifera</i>	연근	12	12	51
	<i>Evodia officinalis</i>	오수유	0	71	67
	<i>Pinus koraiensis</i>	갓	41	0	67
	<i>Dioscorea japonica</i>	녹두	51	13	51
	<i>Lecocasia esculenta</i> Schott.	토란	21	0	62
	<i>Perilla sikokina</i>	차조기	0	23	22



Table 3-3-3. First screening for inhibitory effect of MMP-1 secretion fractions extracted from seaweeds

Samples		Inhibitory effect of MMP-1 secretion(%)		
Scientific name	Korean name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
<i>Laminaria japonica</i>	다시마	58	13	0
<i>Endarachne binghamiae</i>	미역귀(완도)	0	0	0
<i>Hizikia fusiforme</i>	뽕	0	0	0
-	왕꼬시래기(제주)	0	0	0
<i>Sargassum fulvellum</i>	모자반(제주)	0	0	0
-	커디움(제주)	0	0	47
-	가시리(제주)	0	0	33
<i>Amphyroa dilatata</i>	개발(제주)	0	0	41
<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	참도박(제주)	2	0	0
-	주몽(제주)	0	0	0
<i>Gelidium amansii</i>	우뭇가사리(제주)	0	0	0
<i>Gelidium hakolatensis</i>	팔끝헛모자반 (제주)	0	0	0
-	가시들가사리 (제주)	0	0	0
-	성목	0	0	0
-	갈래곰보(제주)	0	0	0
-	개도박	0	0	19
<i>Carpopeltis angusta</i>	붉은뼈까막살 (제주)	0	0	0
<i>Codium fragile</i>	말청각(제주)	0	0	0
-	성미(제주)	0	0	0
-	기피래(제주)	0	0	0
<i>Acorus calamus var.angustatus</i> Besser	창포	0	54	60
-	진도바리(제주)	0	35	30
-	지름몸	0	7	35
<i>Codium latum</i>	넙청각(제주)	0	0	52
<i>Galaxaura falcata</i>	갈라가라(제주)	0	0	0
<i>Schyzimonia dubi</i>	갈래잎(제주)	0	22	26
<i>Chondrus ocellatus</i>	진두발(제주)	0	0	73
<i>Phaceloearpus japonicus</i>	뽕꼬리(제주)	0	0	41
<i>Ishige okanmutrai</i>	괘(제주)	0	0	0
<i>Undaria pinnatifida</i>	미역(진도)	23	15	3
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	다시마(주문진)	48	0	0

Samples		Inhibitory effect of		
		MMP-1 secretion(%)		
Scientific name	Korean name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
-	우미(제주)	0	0	36
-	진저리	0	0	36
<i>Pelvetia wrightio</i>	뜸부기	0	0	39
<i>Endarachne binghamiae</i>	미역쇠	45	0	0
-	고추나물	7	0	0
<i>Gelidium amansii</i>	우뭇가사리(제주)	0	0	0
<i>Undaria pinnatifida</i>	미역(기장)	15	0	41
-	진동아리	57	0	54
<i>Chondria crassicaulis</i>	서실	0	0	0
<i>Porphyra tenera</i>	참도박(속초)	0	23	0
-	꼬리나물	0	0	0
-	가시우묵(제주)	0	0	0
-	개몸(제주)	0	0	68
<i>Eoklonia cava</i>	감태(제주)	0	51	0
-	주충(제주)	0	0	0
-	고장풀	0	0	41
<i>Undaria pinnatifida</i>	미역(울산)	0	40	0
-	갈색대마디말(제주)	0	0	0
<i>Cystosiria hakoclatensis</i>	파배기모자반(제주)	0	0	0
<i>Plocamium telfarreae</i>	플로카미움(제주)	0	0	47
<i>Undaria pinnatifida</i>	돌각미역(강진말산)	0	0	0
<i>Sargassum fulvellum</i>	큰잎모자반	0	0	9
<i>Undaria pinnatifida</i>	미역(해창)	0	0	0
<i>Enteromorpha prdifer</i>	가시파래(완도)	34	0	0
<i>Galaxaura falcata</i>	갈라가라(제주)	0	0	0
<i>Schyzimonia dubi</i>	갈래잎(제주)	0	22	26
<i>Porphyra tenera</i>	김(사천)	0	0	0
-	바래등불	0	0	43
<i>Ecklonia stolonifera</i>	곰피(삼척)	0	0	46
<i>Monastroma nitidum</i>	파래(완도)	58	26	0
<i>Gelidium amansii</i>	우뭇가사리(기장)	12	66	39
<i>Porphyra tenera</i>	김(서해)	0	0	0

Table 3-3-4. Second screening for inhibitory effect of MMP-1 secretion

Samples		Inhibitory effect of MMP-1 secretion(%)		
Scientific name	Korean name	Fr.1	Fr.4	Fr.5
Raphanus sativus	래디쉬	22.40	47.87	0
Eucommia ulmoides	두충	31.43	68.10	35.62
Angelica gigas	당귀	16.15	62.11	47.37
Lycium chinense	구기자	40.66	48.89	39.63

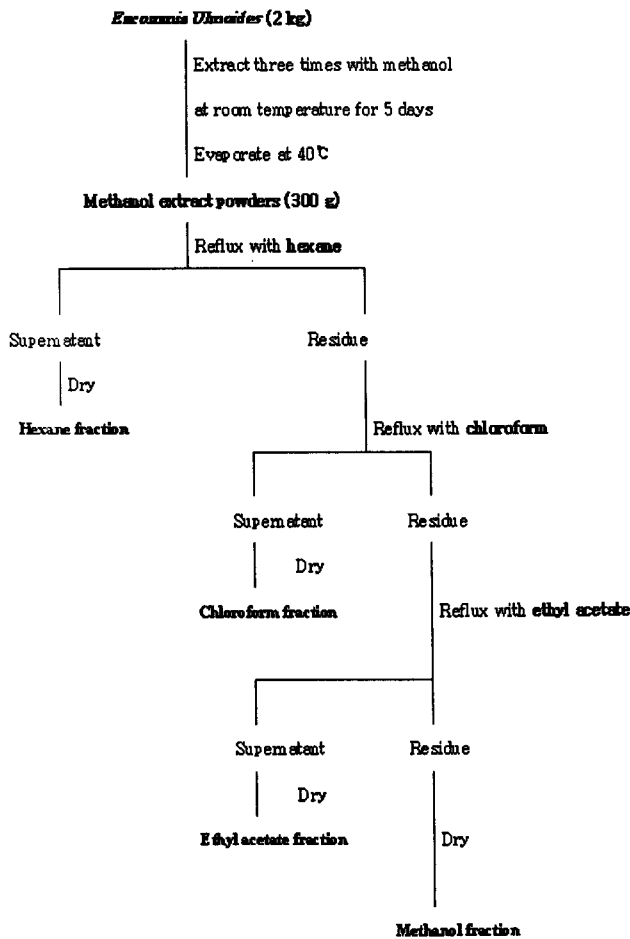
Table 3-3-5. Body weight and survival rate of mice orally administrated *Eucommia ulmoides* on acute toxicity

Group	No. of mice	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	No. of mice survived	Survival rate (%)
Control	8	30.58 ± 2.15	31.98 ± 1.76	8	100
500 mg/kg	8	29.98 ± 2.78	31.51 ± 3.4	8	100
1,000 mg/kg	8	29.11 ± 4.48	30.97 ± 4.45	8	100
1,500 mg/kg	8	30.07 ± 3.23	31.25 ± 1.23	8	100

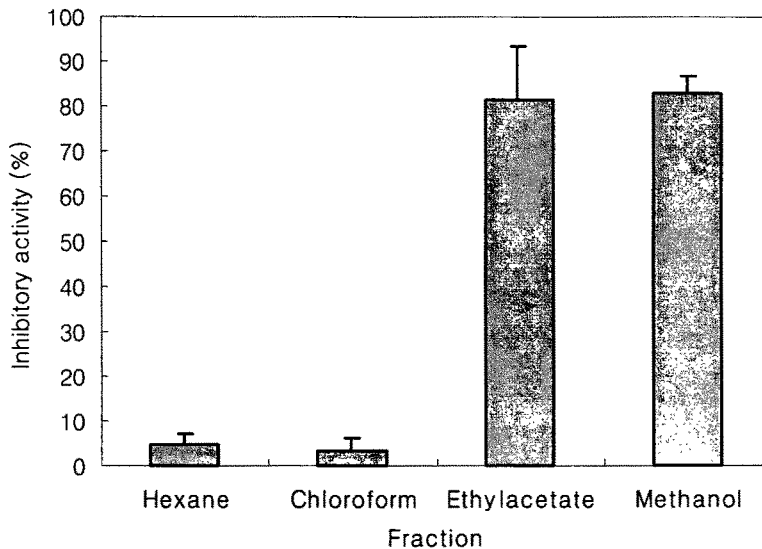
나. 두충 함유 MMP-1 억제활성물질의 정제 및 구조동정

1) 두충의 methanol 추출 및 유기용매 분획

외인성 피부노화 제어 물질을 정제하기 위해 시료로 선정된 두충을 Scheme 3-3-2에 기술된 방법에 따라 대량추출을 실시하였다. 두충 2 kg을 4회 methanol로 추출한 methanol 추출물을 hexane, chloroform, ethylacetate로 분획한 후, 남은 잔사를 methanol 분획으로 하였다. 각 분획별로 MMP-1 활성억제를 ELISA로 측정된 결과 Fig. 3-3-1과 같이 methanol, ethylacetate 분획의 순으로 MMP-1의 억제활성을 나타냄에 따라 본 연구에서는 1차적으로 methanol 분획내 함유된 활성물질을 목표로 다음과 같이 정제를 실시하였다.



Scheme 3-3-2. Flow sheet for extraction of active component from *Eucommia ulmoides*.



**Fig. 3-3-1. Inhibitory effect of each fraction fractionated from *Eucommia ulmoides* methanol extract.**

### 2) Silica-gel 60 open column chromatography

상기의 두층 methanol 분획을 1, 2차 silica gel 60 open column chromatography로 분리하였다. 1차 column에서 chloroform과 methanol 100 : 0 부터 0 : 100으로 극성도를 10%씩 stepwise로 변화시키면서 각 단계의 용매로 5 bed volume씩 용출시킨 후 각 획분의 MMP-1 활성억제 효과를 검토한 결과, chloroform : methanol = 20 : 80과 30 : 70에서 MMP-1 억제활성을 갖는 분획을 분리하였다(Fig. 3-3-2). 1차에서 분리된 분획으로 2차 silica gel 60 open column chromatography를 실시하여 chloroform : methanol = 22 : 78에서 가장 높은 MMP-1 억제활성을 갖는 용출획분을 분리하였다(Fig. 3-3-3).

### 3) Prep-TLC

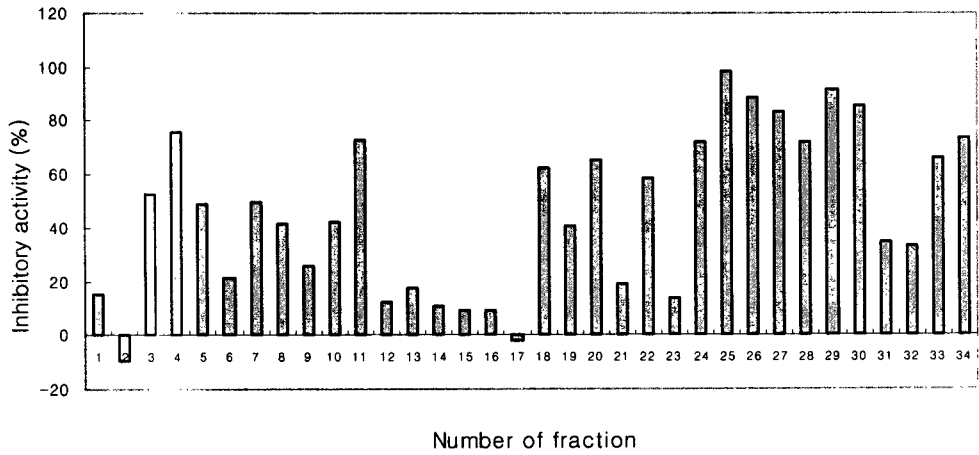
고활성 상기 분획물을 ODS gel plate(20 × 10 cm)에서 isopropanol : water = 3 : 2의 전개용매로 prep-TLC(thin layer chromatography)를 실시하여 얻은 5개 획분을 각각 농축하여 MMP-1 억제활성을 측정 한 결과  $R_f$ 값이 0.7인 3번째 획분에서 가장 높은 억제활성을 보였다(Fig. 3-3-4).

#### 4) HPLC

상기에서 분리 용출한 활성획분을 HPLC(u-Bondapak C<sub>18</sub>, 7.8 × 300 mm)에 주입하고 물과 methanol의 linear gradient (H<sub>2</sub>O : MeOH = 100 : 0 ~ 0 : 100)와 3 ml/min의 유속으로 용출하여 활성획분만을 농축한 후, 활성획분을 u-Bondapak C<sub>18</sub> (3.9 × 150 mm) column을 사용하여 물 : acetonitrile = 97 : 3 용매조건으로 analytical HPLC를 실시하여 MMP-1 억제활성을 보이는 peak를 얻었다 (Fig. 3-3-5).

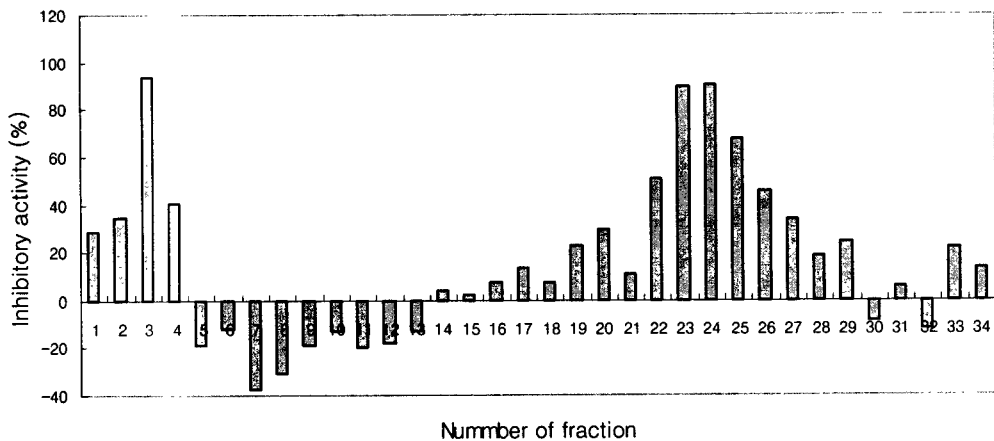
#### 5) 정제물질의 구조동정

HPLC로부터 분리한 MMP-1 활성억제물질의 peak를 농축하여 <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, 11.4 TeslaAvance-500, Bruker, German)을 이용, 구조분석한 후 chemicals library를 이용하여 검색한 결과 aucubin과 유사한 pattern을 보임에 따라 authentic으로 Wako사의 시판 aucubin을 사용하여 <sup>1</sup>H-NMR 및 HPLC 분석을 실시하였다. 그 결과 Fig. 3-3-6과3-3-7과 같이 두층으로부터 정제한 시료가 시판 aucubin과 일치함으로써 이 정제 MMP-1 억제활성물질을 aucubin으로 동정하였다.



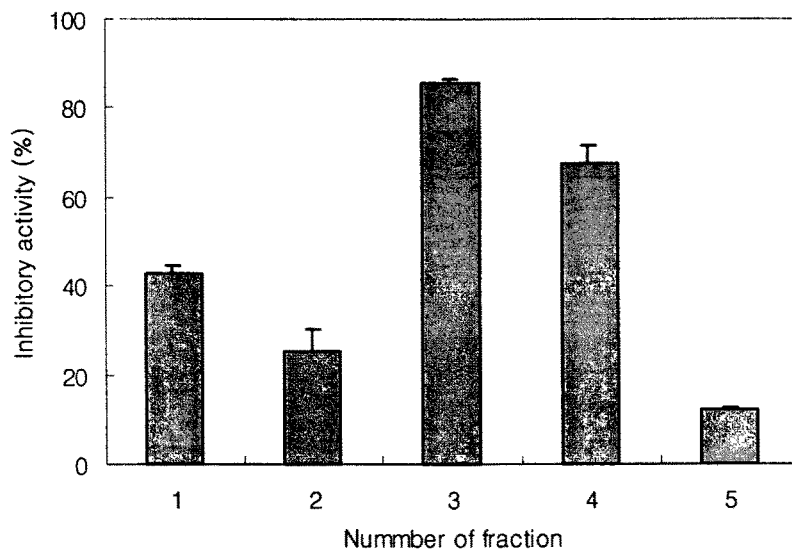
**Fig. 3-3-2. MMP-1 inhibitory activities of fractions eluted by 1st silica gel open column chromatography.**

Eluant was mixtures of chloroform and methanol (1: 100:0, 2-5: 90:10, 6-9: 80:20, 10-13: 70:30, 14-17: 60:40, 18-21: 50:50, 22-25: 40:60, 26-29: 30:70, 30-33: 20:80 and 34: 0:100)

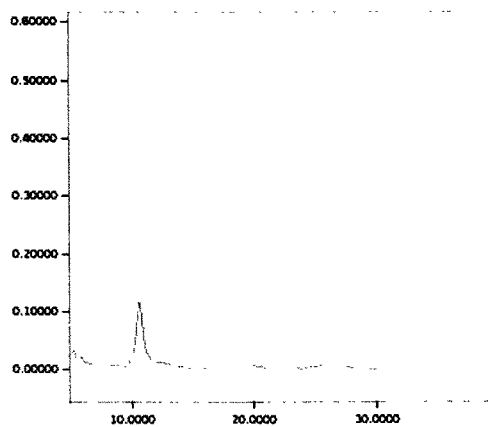


**Fig. 3-3-3. MMP-1 inhibitory activities of fractions eluted by 2nd silica gel open column chromatography.**

Eluant was mixtures of chloroform and methanol (100:0 (No. 1), 80:20 (No. 2), 55:45 (No. 3), 40:60 (No. 4), 37:63 (No. 5), 35:65 (No. 6), 32:68 (No. 7), 30:70 (No. 8-12), 27:73 (No. 13-17), 25:75 (No. 18-22), 22:78 (No. 23-27), 20:80 (No. 28-32) 15:85 (No. 33) and 0:100 (No. 34))



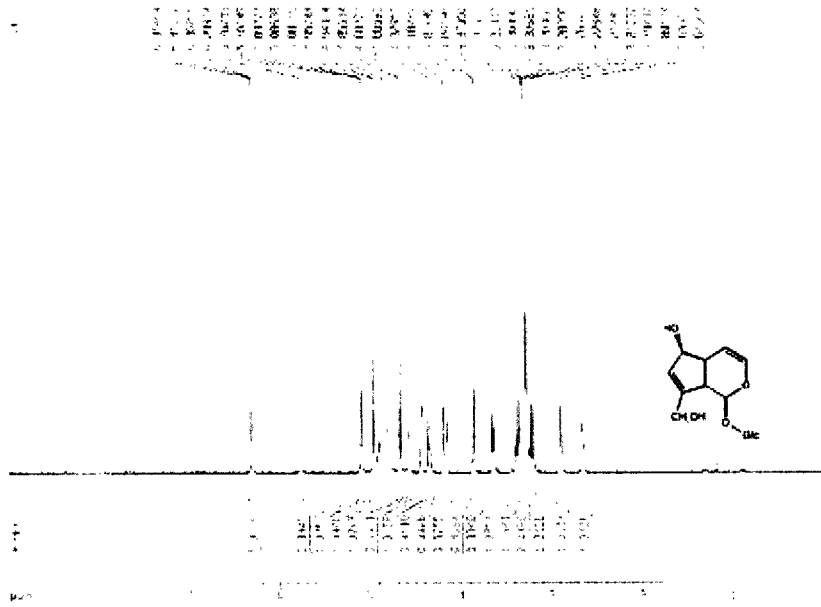
**Fig. 3-3-4. MMP-1 inhibitory activity of fractions isolated by TLC.**



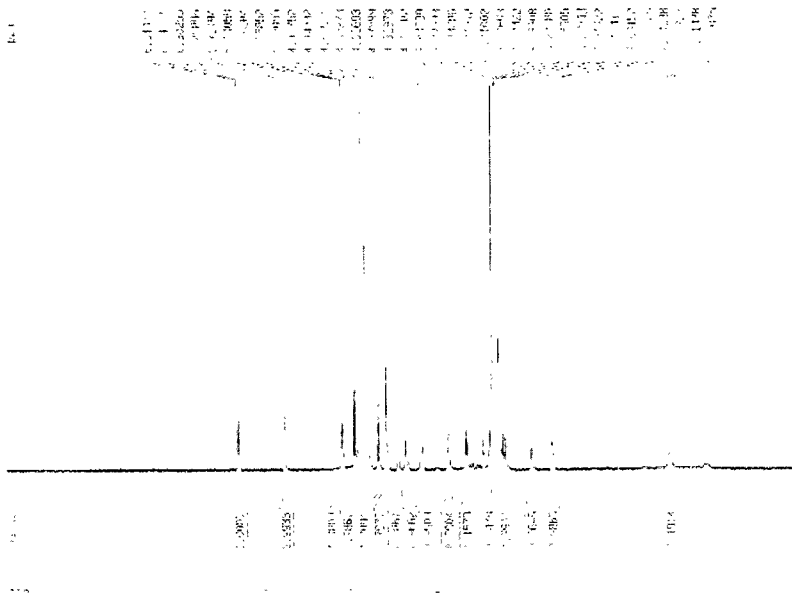
**Fig. 3-3-5. HPLC chromatogram of isolated compound.**

HPLC was performed Waters M515 system equipped with UV detector (at 206nm) and Waters  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (reverse phase type, 3.9 × 150mm) using Water : Acetonitrile = 97 : 3





Isolated compound from *Eucommiae ulmoides*



Standard aucubin (Wako)

Fig. 3-3-6. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of isolated compound and commercial aucubin.

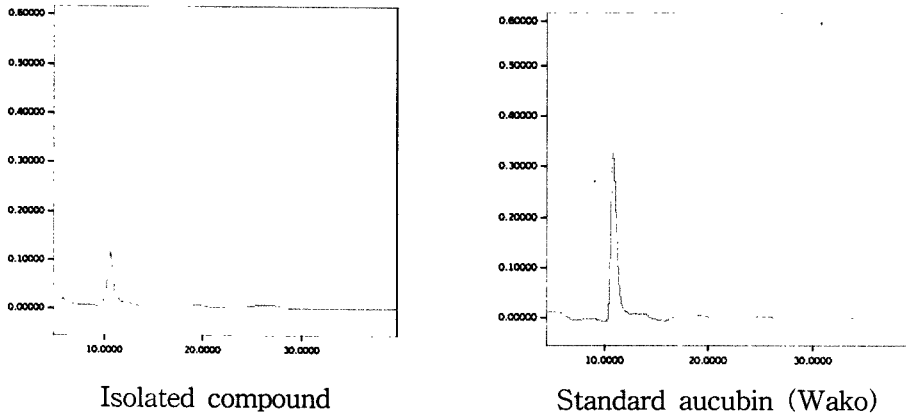


Fig. 3-3-7. HPLC chromatography of isolated compound and aucubin.

## 다. 두층으로부터 분리된 aucubin의 생리학적 특성

### 1) Aucubin의 cytotoxicity

두층 methanol 추출물은 mouse에 대해 급성독성이 없음이 확인되었으나 methanol 추출물로부터 분리한 aucubin의 cytotoxicity를 검토할 목적으로 MTT assay를 이용하여  $10^{-2}$  mg/ml ~  $10^{-7}$  mg/ml의 농도에서 조사한 결과 HS68 cell line에 대한 세포독성은 나타나지 않았다 (Fig. 3-3-8).

### 2) Aucubin의 항산화활성

#### 가) Superoxide anion radical 소거활성

두층에서 분리한 aucubin의 MMP-1 억제활성기작을 규명하기 위해 1차적으로 항산화활성을 측정하였다. Fig. 3-3-9는 superoxide anion radical의 소거활성을 측정한 결과로 aucubin은 *in vitro*에서 생성되는  $O_2^{\cdot-}$ 의 소거능을 나타내었으며 고농도 (10  $\mu$ g/ml)보다 저농도인 1  $\mu$ g/ml ~ 0.1  $\mu$ g/ml에서 소거능이 높음을 알 수 있었다.

#### 나) $H_2O_2$ 에 대한 세포보호활성

Aucubin의 세포보호활성을 검토하기 위해 과산화수소 농도별로 처리한 HS68 cell에 대하여 aucubin의 농도에 따라 cell viability를 조사하였다. 그 결과 2.5 mM 이하의 과산화수소 처리시 무처리구에 비해 30% 내외의 세포보호활성을 나타내었으며 aucubin의 농도에 대한 효과는 상기  $O_2^{\cdot-}$  소거활성과 유사하게 저

농도에서 활성이 높은 경향을 보였다 (Fig. 3-3-10).

#### 다) MDA 생성 저해효과

Aucubin의 자외선조사에 의한 지질과산화 저해활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3-3-11에서와 같이 1 ~ 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 aucubin 첨가시 자외선을 처리하고 aucubin을 첨가하지 않은 구에 비해 약 30 ~ 40% MDA 생성저해 효과를 보였으며 대조구보다는 10 ~ 20% 높은 값을 나타내었다. 이상의 결과들로부터 두층 methanol 추출획분에서 분리한 aucubin은 높은 항산화활성과 이에 따른 세포보호활성을 보임을 알 수 있었다.

### 3) MMP-1 억제활성

두층으로부터 분리한 aucubin의 MMP-1 억제활성을 Fig. 3-3-12에서와 같이 농도에 따라 검토한 결과 1 ng/ml 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 증가하였으나 1 ng/ml 이하에서는 증감을 나타내지 않았다. 한편 두층에서 분리한 aucubin의 실용화 가능성을 검토할 목적으로 피부노화억제물질로 사용되고 있는 vitamin E, vitamin C와 aucubin의 MMP-1 억제활성을 측정, 비교하였다. 그 결과 aucubin은 농도에 관계없이 vitamin C와 유사한 억제활성을 보였으며 vitamin E의 경우에는 농도에 따라 10 ng/ml 이상에서는 같거나 높은 억제활성을 보인 반면 1 ng/ml에서는 낮은 값을 나타내었다 (Fig. 3-3-13).

### 4) MMP-2 억제활성

Collagenase의 다른 family의 하나인 MMP-2 억제활성을 Fig. 3-3-14에서와 같이 농도에 따라 검토하였다. 그 결과 100 ng/ml 농도 이상에서는 활성증가를 나타내지 않음으로써 포화를 나타내었고 100 ng/ml 이하에서는 농도 의존적으로 활성이 감소함을 알 수 있었다. 또한 앞서에서와 같이 aucubin의 실용화 가능성을 검토하기 위해 vitamin C 및 vitamin E와 비교한 억제활성의 세기는 일정한 경향을 보이고 있지는 않지만 이들 물질보다 농도에 관계없이 높은 값을 나타냄으로써 상기 MMP-1의 억제활성과 함께 높은 실용화 가능성을 시사해주었다 (Fig. 3-3-15).

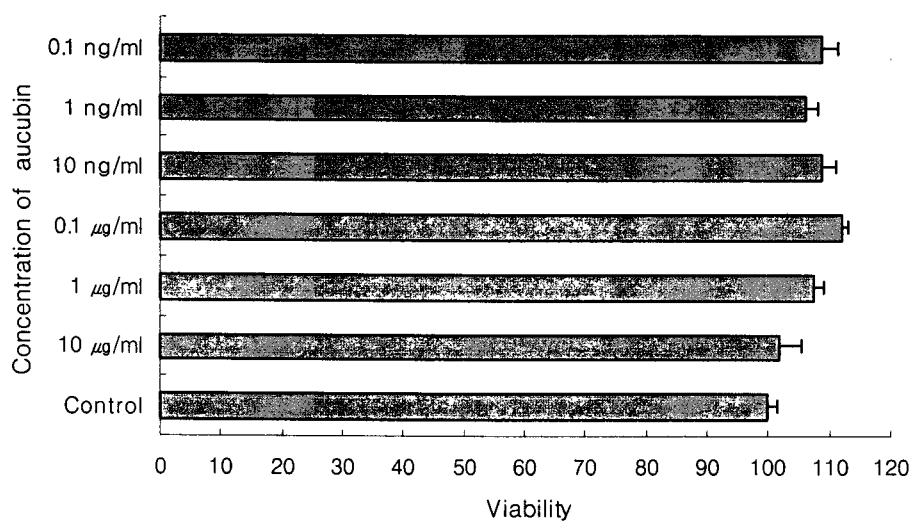


Fig. 3-3-8. Effect of aucubin concentration on HS68 cell viability.

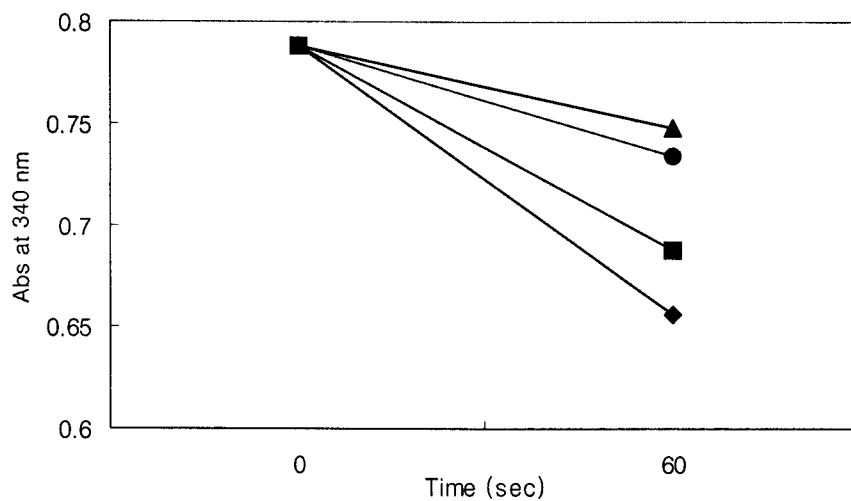
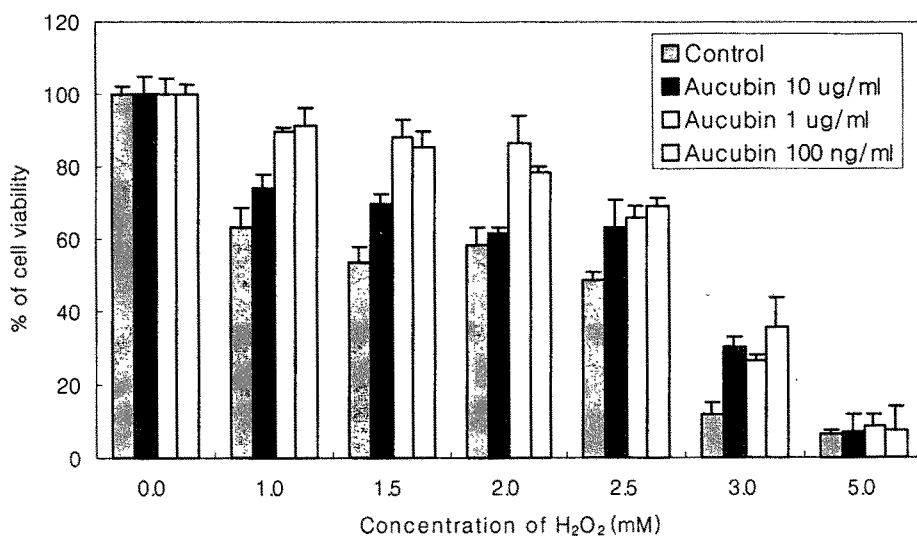
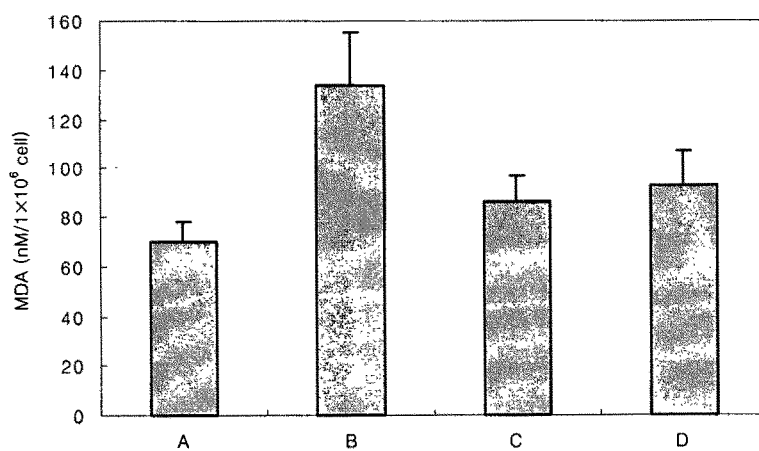


Fig. 3-3-9. NADH oxidation and scavenging activities of aucubin in LDH-NADH oxidation assay system.





**Fig 3-3-10. Effect of aucubin concentration on viability of HS68 treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**



**Fig. 3-3-11. Protecting effects of aucubin on HS68 membrane damages.**

The levels of malondialdehyde(MDA) were measured by the reaction with thiobarbituric acid.

A : Untreated control

B : UVB (100 mJ/cm<sup>2</sup>) irradiation only

C : Pretreated with aucubin (1 μg/ml) before UVB (100 mJ/cm<sup>2</sup>)

D : Pretreated with aucubin (100 ng/ml) before UVB (100 mJ/cm<sup>2</sup>)

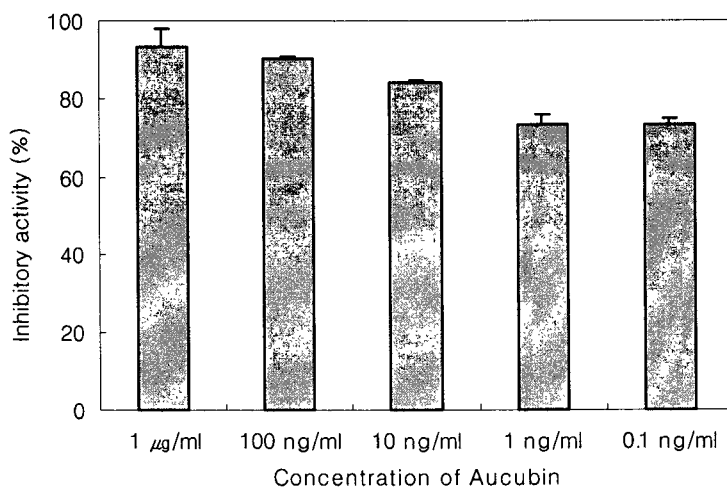


Fig. 3-3-12. MMP-1 inhibitory effects of aucubin isolated from *Eucommiae ulmoides*.

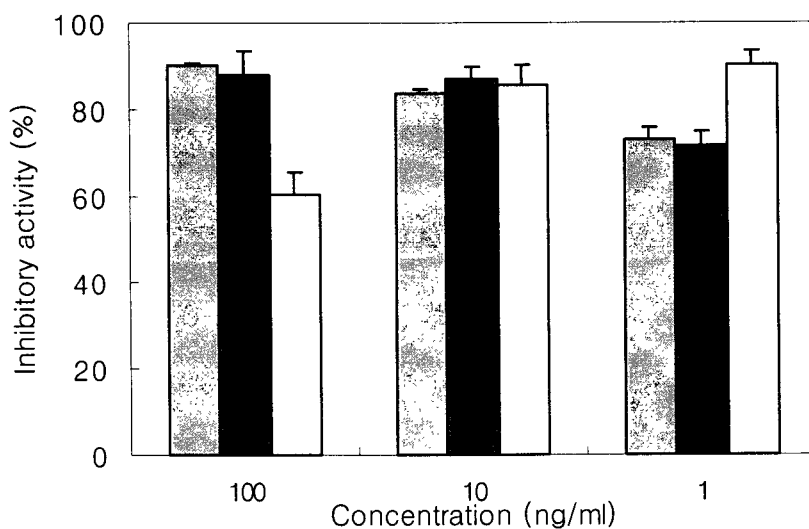


Fig. 3-3-13. MMP-1 inhibitory effects of aucubin, vitamin C and vitamin E.

□ Aucubin    ■ Vitamin C    □ Vitamin E

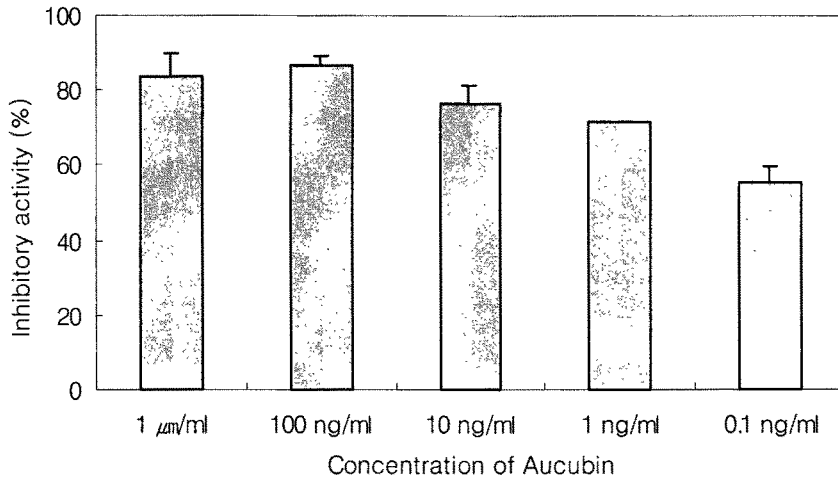


Fig. 3-3-14. MMP-2 inhibitory effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides*.

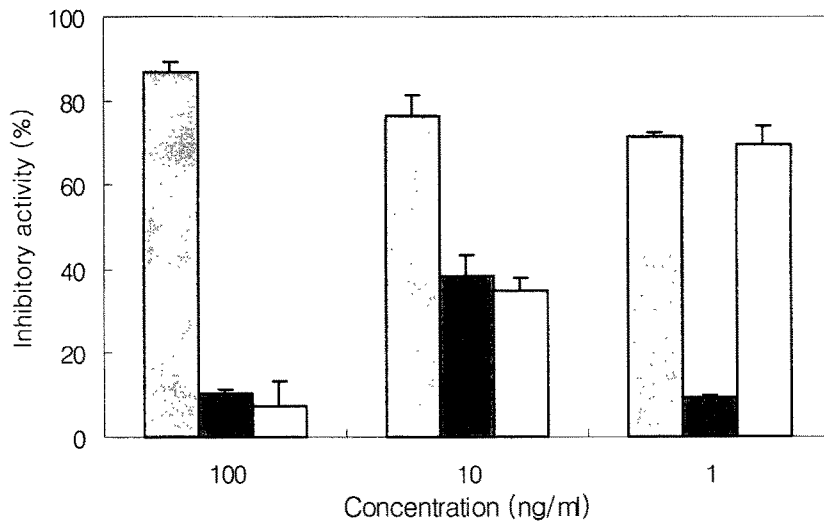


Fig. 3-4-15. MMP-2 inhibitory effects of aucubin, vitamin C and vitamin E.

□ Aucubin      ■ Vitamin C      □ Vitamin E

## 제 4 절 비만, 당뇨 예방용 glucose uptake 조절 미량 소재의 실용화

### 1. 서 설

현대 의학의 발달에 따라 평균 수명이 증가하고 사망 원인도 인구의 노령화, 운동 부족, 잘못된 식습관 등과 밀접한 관련을 가지고 변화하고 있다. 최근 10년 동안의 사망 원인 중 당뇨병 사망률이 2.5배 증가하고 동맥경화, 뇌졸중 등 특히 비만에 의한 사망이 크게 증가하고 있다. 비만이 반드시 이들 성인병의 직접적인 원인이라고 말할 수는 없으나 비만해지면 간에서 당 생산의 증가, 말초 기관에서 인슐린 효과의 저하와 함께 많은 식사량에 따른 혈당의 상승 등 그 촉매 역할을 한다는 점은 의심할 바가 없다. 세계적으로 당뇨병은 지역에 관계없이 발병하고 있으며 발병을 또한 증가 추세에 있을 뿐만 아니라 합병증에 의해 사망에 이르는 대표적인 성인병 중의 하나이다. 1998년 WHO (세계보건기구)의 보고서에 의하면 향후 25년 이내에 현 1억 4천만명의 당뇨병환자가 3억명으로 2배이상 증가할 것으로 예측됨으로써 당뇨병의 예방, 제어 및 치료법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

당뇨병은 인슐린의존성당뇨(IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus)와 인슐린비의존성당뇨(NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus)로 구분되며 선진국에서는 NIDDM이 크게 증가하고 있다. 이 NIDDM은 에너지의 과잉섭취와 운동부족 등의 외부환경인자에 영향을 받고 있으며 실제로 이들 외부인자는 비만과도 관련되어 NIDDM 환자 중 여성의 70%와 남성의 50%가 비만으로 나타나 있다. 비만은 인슐린 저항성을 유도하기 때문에 비만치료에 사용되고 있는 식사제한, 과혈당개선, 적절한 에너지 유지 및 흡수저해, 발열촉진 등이 NIDDM의 처치에 효과적인 것으로 보고되고 있으나 실제 당뇨환자들에 있어 칼로리섭취와 식사량을 제한하는 일은 쉬운 일이 아니다. 식이 탄수화물의 소장내 흡수는 amylase와 glucosidase에 의해 소화되어 포도당으로 분해된 후 소장 상피세포에서 흡수, 수송된다. 이 수송에 관여하는 운반체는 GLUT(sodium-independent glucose transporters) 계열과 SGLT(sodium-dependent glucose transporters) 계열로 대별되며, 포도당은 SGLT1의 작용에 의해 소장내에서 흡수된다. SGLT1은 소장내 가장 함량이 높은 포도당운반체로서 상피세포의 BBMV(brush border membrane vesicle)에 존재하기 때문에 포도당 과다 흡수에 의한 비만과 당뇨의 예방용 소재개발에 있어 주목을 받아온 운반체 중의 하나이다.

따라서 SGLT1의 생합성 억제 또는 활성저해에 의한 비만, 당뇨의 예방 및 치료제 개발 전략은 기존의 전분가수분해효소 저해제에 의한 방법에 비해 음식물



의 섭취량과 종류에 관계없이 포도당의 흡수를 직접적으로 제어할 수 있다는 관점에서 유효성이 높다. 이들 중 GLUT은 glucose의 흡수 연구와 insulin action에 연관되어 있고 특히 GLUT1과 3은 basal에 존재하여 glucose의 uptake에 관계한다. 이들 transporter를 저해하는 물질에 대한 연구가 flavonoid계 물질을 중심으로 진행되고 있으나 저해효과만을 확인하였을 뿐 저해 기작은 아직 밝혀지지 않은 상태이다. 최근 flavonoid류 quercetin의 glucose uptake 저해효과가 밝혀지면서 식·약용 생물자원에도 저해활성 성분이 함유되어 있을 것으로 예상되며, 이 성분들을 소재화하여 장에서의 glucose 흡수를 낮출 수 있다면 비만에 의해 촉매되는 당뇨 등 성인병에 있어 다이어트의 스트레스를 덜어 줄 수 있는 최선의 방안이라 하겠다.

Glucose uptake에 관한 연구는 주로 GLUT, SLUT 등의 glucose transporter 중심으로 이루어져 왔고, 비만, 당뇨 관련 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. Ellwood 등은 Caco-2 cell을 통한 단당류의 흡수와 이용을 연구했고, Bissonnette 등은 세가지 단당류의 흡수와 glucose transporter의 관계를 역시 Caco-2 cell에서 관찰하였다. Caco-2 cell line은 인간의 대장암 세포로부터 분리, 개발시킨 cell line으로 연속된 분화상태와 형태가 소장 소화·흡수 시스템을 잘 나타내고 있어 미네랄을 비롯한 영양물질의 uptake나 transport의 기전을 표현할 수 있는 모델로 널리 사용되어 왔다. 최근 박 등은 flavonoid의 glucose uptake의 저해효과를 U937 cell에서 밝힌 바 있으며, 천연물 소재와 glucose 관련 연구로는 Onomura 등의 ginseng radix에 의한 glucose의 흡수 저해가 있다. 그 밖에 Stumpel 등에 의해 장에서의 glucose uptake와 간 관련 연구도 보고되어 있으나 주로 기전적인 연구들로 실용적인 측면에서의 연구개발이 요구되고 있다. Caco-2 세포주는 주로 금속과 지질의 흡수 연구에 이용되어 왔고 최근에 이르러 SGLT1이 밝혀짐에 따라 BBMV(brush border membrane vesicles)와 함께 포도당 흡수기작의 규명에 사용되었다. 그러나 Caco-2를 이용한 소장내 포도당 흡수저해물질에 관한 연구는 녹차 추출물인 T-1095 물질의 streptozotocin 유도 당뇨쥐의 과혈당 개선효과, 녹차 카테킨에 의한 소장 포도당의 수송조절, 녹차 polyphenol의 경쟁적 Na 의존성 포도당 수송저해 등이 보고되어 있을 뿐 소장에서 포도당 흡수저해제의 개발에 관한 연구는 미미하다.

석류 (*Punica pranatum*)는 지중해 연안과 서남아시아 지방에서 일찍이 재배하기 시작한 과수로 우리나라에는 중국을 거쳐 3세기말 이후에 들어왔으며 현재는 주로 중국 (서안), 미국 (캘리포니아), 인도 등에서 대량으로 50종 이상이 재배되고 있다. 석류열매의 성분은 주로 tannin (10.4~21.3%), gallic acid (4.0%), mannitol (8.0%), sucrose (2.7%), pectin (0.6%)과 소량의 malic acid 등으로 구성되어 있다. 대한약전에 수재된 석류피는 조충구제약으로 석류열매는 지사작용

과 세균성 이질을 고치는 효능이 있는 것으로 알려진 바 있으나 석류열매가 소장에서 포도당 흡수를 저해하는 효과가 있음이 보고되어진 바는 없다.

따라서 본 연구에서는 성인병 질환의 주원인으로 지적되고 있는 비만과 대표적인 성인병의 하나인 당뇨를 예방함에 있어 장관 내에서 glucose의 흡수를 조절할 수 있는 미량소재를 식·약용 식물자원으로부터 분리, 정제하여 활성본체의 구조와 특성을 규명하고 실용화 가능성을 검토하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 재료

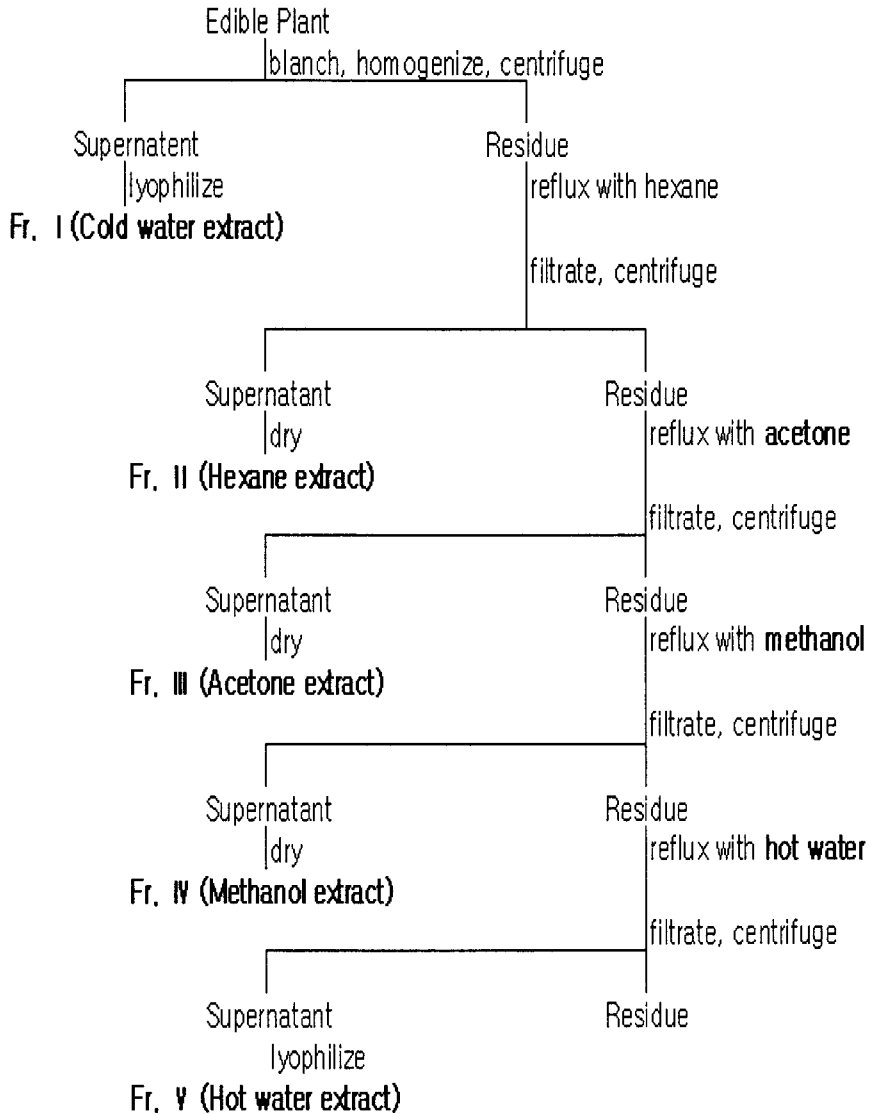
본 실험에서 사용된 국내산 식·약용 식물 약 60여종은 서울 시내 백화점, 경동시장, 수협 등지에서 산지가 표시된 것만을 구입 또는 공급받아 사용하였다. 최종 선별된 석류(*punica granatum*)는 경동시장에서 구입하여 다단계의 대량추출 과정을 거쳐 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 Caco-2 human colonic cell line은 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 분양받았으며, DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), FBS(fetal bovine serum), antibiotics 등은 Gibco-BRL사 (Grand Island, USA), sodium bicarbonate, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide), DMSO (dimethyl sulfoxide) 등은 Sigma사 (St. Louis, USA)로부터, 2-NBDG (2-(N-C7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose)는 Molecular Probes Inc. (NY, USA)로부터 구입하였으며, SGLT1은 Chemicon International Inc. (Temecula, USA) 제품이다. 본 실험에서 사용된 동물은 6~7주령의 SPF, ICR 계 수컷 mouse로 대한실험동물에서 분양받아 사용하였으며, 실험동물은 온도 22±2℃, 습도 55~60%에서 1일 12시간씩 점등 하에, 물과 사료를 자유로이 급식시키면서 사육하였다.

### 나. 방법

#### 1) Glucose uptake 저해활성물질 검색용 시료의 조제

각각의 시료는 Scheme 3-4-1의 방법에 따라 100℃에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성시키고 동결건조한 다음 5,000 rpm에서 5분, 6,000 rpm에서 5분, 7,000 rpm에서 20분간 homogenizer (IKA Labortechnik Co. Ultra-turrex T50, Germany)로 파쇄한 후 5,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 냉수추출획분(Fr. I)으로 하였다. 침전물은 동결건조 후 극성도에 따라 hexane, acetone, methanol, hot water 순으로 2시간 동안 환류 추출한 후

각각을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III, IV, V의 용매별 추출획분을 조제하였다.



Scheme 3-4-1. Systematic extraction procedure for various edible plants.

## 2) Glucose uptake 저해활성 assay계

Glucose uptake 저해활성 측정용 assay계는 Caco-2 cell과 2-NBDG를 이용하여 Fig. 5-1과 같이 확립하였다. 즉, 각 분획물에 대한 포도당 흡수저해 실험을 위해 Caco-2 (human colonic cancer cell)을  $6 \times 10^4$  cells/well 농도로 24 well-plate, 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 13~14일 동안 배양한 후 PBS로 2회 세척한 다음 PBS 400  $\mu$ l, 100  $\mu$ M 2-NBDG 500  $\mu$ l, sample (1 mg/ml) 100  $\mu$ l를 첨가하고 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이 반응액을 제거하고 세포를 ice-cold PBS로 3회 세척한 후 2-NBDG의 형광세기를 spectrophotofluorometer (여기 : 485nm, 발광 : 535nm)로 측정하였다. Glucose uptake 양 측정에 미치는 세포농도의 영향을 보정해 주기 위해 MTT assay를 다음과 같이 실시하였다. 형광세기 측정이 끝난 well plate에 MTT 용액 (5 mg/ml) 50  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 3시간 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 의한 포도당 흡수 저해활성은 아래 식에 따라 환산하였다.

$$\text{Inhibitory effect (\%)} = [(F_c - F_s) / F_c] \times 100$$

F<sub>s</sub> : 시료를 처리한 실험구의 형광세기

F<sub>c</sub> : 시료를 처리하지 않은 실험구의 형광세기

Glucose transport 측정은 transwell을 이용하여 실시하였으며(Scheme 5-2), BBMV (Brush-border membrane vesicles)를 이용한 glucose uptake 저해활성은 Scheme 5-3과 같은 assay계를 확립한 후 측정하였다. 또한 이러한 저해 활성 추출획분의 SGLT1 (sodium-dependent glucose transporter1) 조절을 살펴보기 위하여 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하여 SGLT1 저해활성을 검토하였다.

## 3) Glucose uptake 저해활성물질의 *in vivo* 독성 실험

선정된 식료 methanol 추출물의 급성독성 여부를 확인하기 위하여 ICR mouse (male, 6~7 weeks old)를 이용하여 시료를 0, 500, 1,000, 1,500 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 mouse에 음용수의 형태로 3주 동안 공급하였다. 3주 동안의 체중변화를 관찰하고 최종일까지 생존한 마리 수를 측정 후 백분율로 표시하였다.

## 4) *In vivo*에서의 glucose uptake 저해활성

실험동물은 체중 30g 내외의 ICR mouse를 구입하여 일주일간 적응시킨 후 난피법에 의해 정상군과 당뇨 실험군으로 각 군당 8 마리씩 나누는 후, 당뇨군은 식

류 methanol 추출물을 공급하지 않는 군과 1,000 mg/kg의 농도로 음용수에 섞어 공급하는 군으로 구분하였다. 당뇨 유발은 일주일의 적응 기간 이후 streptozotocin (STZ) 80 mg/kg을 citrate buffer pH 4.3에 용해시키고 복강을 통해 주사한 후 혈당 농도가 200 mg/dL 이상인 당뇨유발 mouse만 실험에 사용하였다. 3주간 정상식으로 공급해 주었고, 식이 섭취량, 음용수 섭취량, 몸무게 변화량 등을 측정하였다. 실험 3주째에 동물을 12시간 절식시킨 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채혈하여 공복시 혈당 수준을 측정, initial data로 한 후 2 g/kg의 glucose를 경구투여한 후 30분, 60분, 90분 및 140분에 꼬리정맥으로부터 채혈하여 정맥혈의 혈당 농도 변화를 혈당계로 측정하였다.

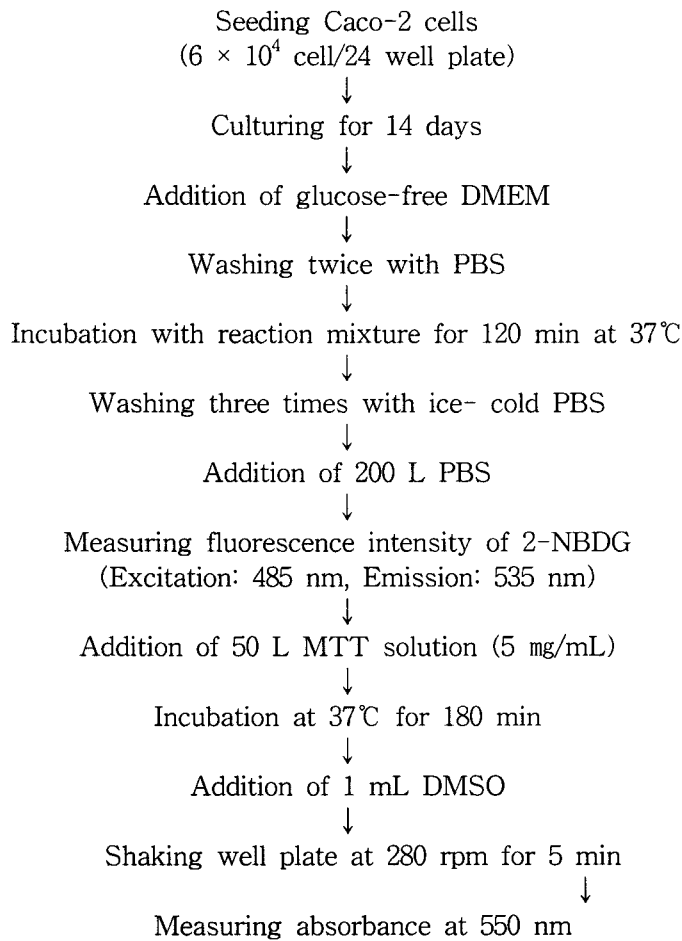
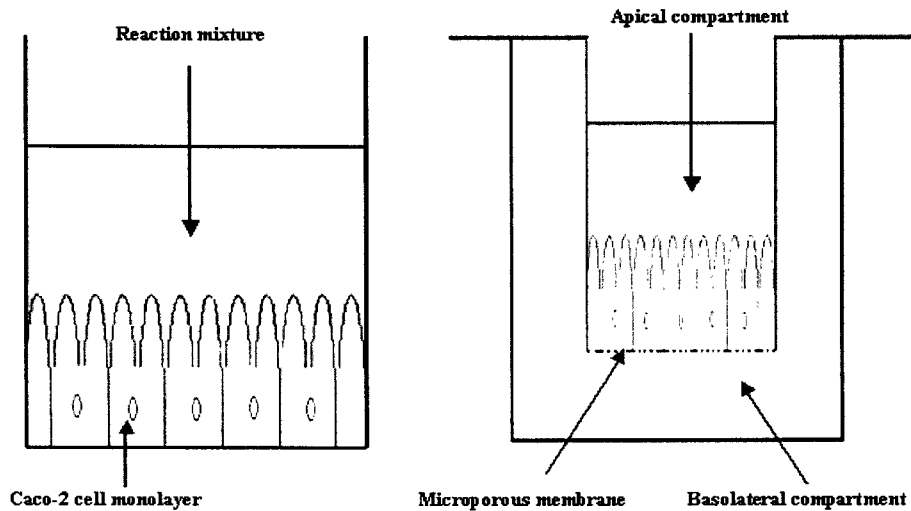
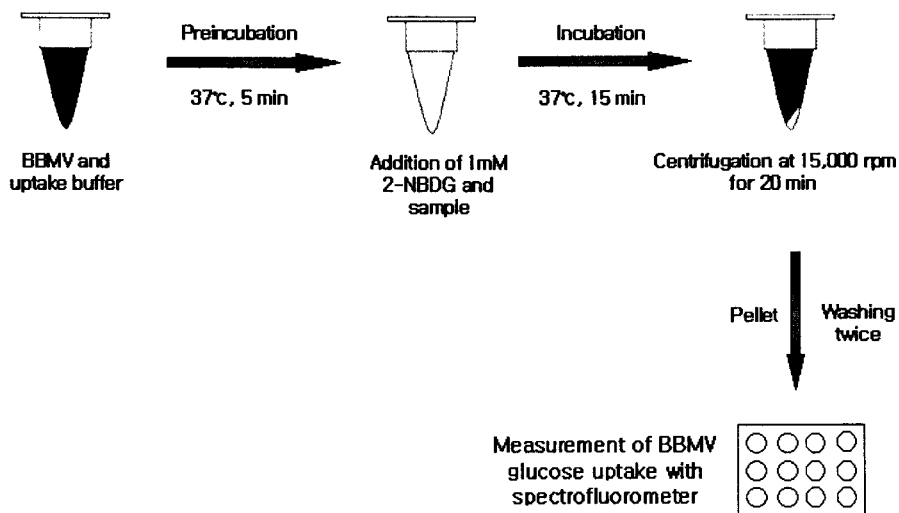


Fig. 3-4-1. Glucose uptake assay system in Caco-2 cell.



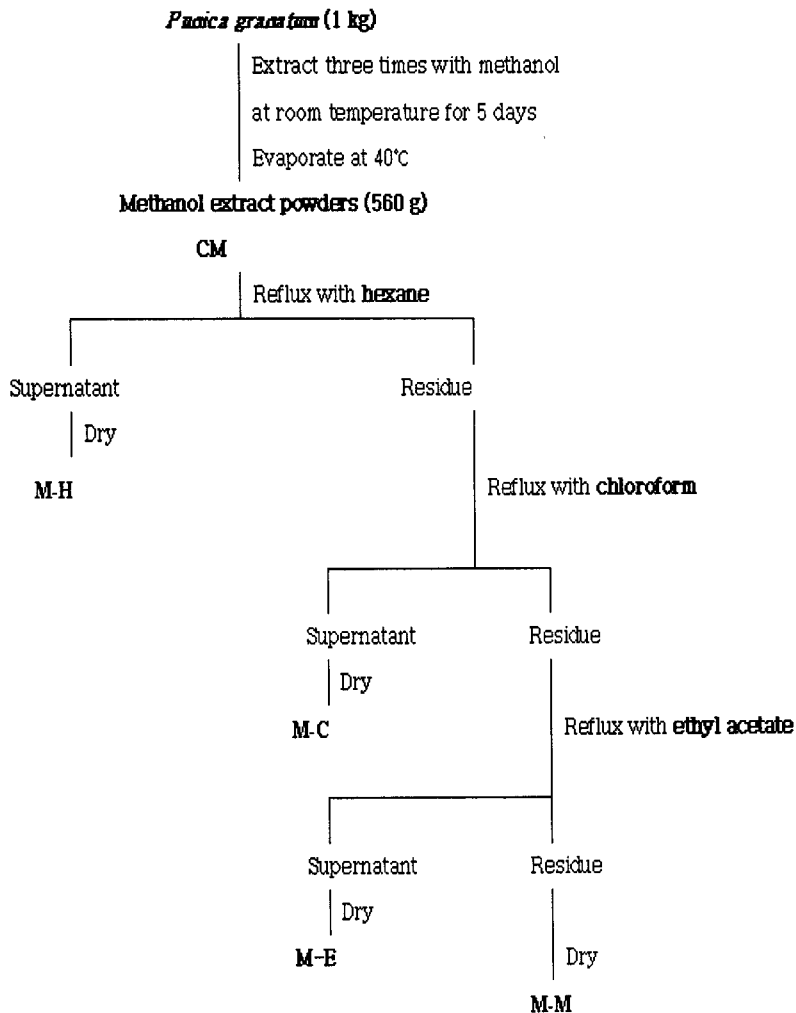
Scheme 3-4-2. Intestinal glucose uptake and transport assay system.



Scheme 3-4-3. Flow sheet of glucose uptake assay using BBMVs from mice intestine.

5) 선정시료 석류의 methanol 추출 및 유기용매 분획

대량으로 구입한 석류 열매를 100℃에서 5분간 blanching하여 생세포내 효소를 불활성화시키고, hand mixer로 곱게 마쇄한 후 1 kg의 석류 조말을 methanol 10 배 부피로 4℃에서 2주 동안 정치시키면서 2회 추출한 후 감압농축하여 석류 methanol 추출물을 조제하였다. 추출물로부터 methanol을 완전히 제거한 후 hexane, chloroform, ethylacetate를 각각 5배 부피로 환류 추출함으로써 각 유기용매별 가용획분을 조제하였다 (Scheme 3-4-4).



Scheme 3-4-4. Flow sheet for organic solvent fractionation of methanol extract from *Punica granatum*.

#### 6) 석류로부터 **glucose uptake** 저해활성물질의 분리 및 정제

CHCl<sub>3</sub>로 활성화된 silica gel 60 column에 유기용매 분획을 통해 예비 분리되어진 M-M을 chloroform과 methanol을 사용하여 1, 2차 silica gel open column chromatography을 실시하여 활성물질을 분리하였다. 예비실험을 통하여 활성획분의 최적 분리되는 조건이었던 MeOH : water = 4 : 1의 전개용매를 사용, ODS gel plate로 Prep-TLC (Thin Layer chromatography)를 실시하여 5개의 획분으로 분리하였다. HPLC C<sub>18</sub> column (Preparative HPLC, 7.8 × 300 mm)에 활성획분을 주입하고 MeOH : water = 95 : 5의 전개용매를 사용하여 3 ml/min의 유속으로 용출, 활성획분만을 농축한 후 2차 HPLC를 동일조건에서 실시함으로써 저해물질을 정제하였다.

#### 7) 석류 함유 **glucose uptake** 저해활성물질의 구조분석

HPLC로 정제된 물질의 <sup>1</sup>H-NMR은 600 MHz, <sup>13</sup>C-NMR은 500 MHz에서 시료의 이화학적 이동 (ppm)을 측정하였으며, EI-MS와 FAB-MS spectrum을 측정하였다.

### 3. 결과

#### 가. 식·약용식물로부터 **glucose uptake** 저해활성물질의 검색 및 시료의 선정

##### 1) 식·약용식물로부터 **glucose uptake** 저해활성물질의 1차 검색

국내산 식·약용식물로부터 비만·당뇨 예방용 **glucose uptake** 조절 미량소재를 실용화시키기 위해 1차적으로 앞서 기술한 방법에 따라 조제한 추출물 60여 점을 대상으로 **glucose uptake** 저해활성물질을 검색한 결과 냉수 추출물 (Fr. I)에서는 두충, 당귀, 산수유, 석류 등이, 메탄올 추출물 (Fr. IV)에서는 래디쉬, 녹차 등이, 열수 추출물 (Fr. V)에서는 감잎 등이 대조군보다 높은 저해활성을 나타내었다(Table 3-4-1).



Table 3-4-1. Screening of glucose uptake inhibitory activity of plant extract

Sample name		Inhibitory effect (%)		
Common name	Scientific name	Fr. I	Fr. IV	Fr. V
Chicory	<i>Cichorium intybus</i> L.	-3.2	-11.3	-17.5
Headanghw	<i>Rosa rugosa</i>	31.3	22.5	-6.2
Hawthorn fruit	<i>Crataegus pinnatifida</i> var. <i>typical</i>	21.7	-27.6	8.8
Mogua	<i>Pseudocaydonia sinensis</i>	1.2	-2.0	-6.1
Arrowroot	<i>Pueraria thunbergiana</i>	14.5	13.3	10.0
Dodder	<i>Cuscuta japonica</i>	15.6	-31.7	-15.1
Marsh mallow	<i>Malva verticillata</i> L.	-8.8	-6.6	4.9
Apricot	<i>Prunus ameniaca</i> var. <i>ansu</i>	18.1	-30.4	-13.9
Shepherd's purse	<i>Capsella bursa-Pastoris</i>	6.3	-3.0	-9.7
Peppermint	<i>Menta arvensis</i> var. <i>japonica</i>	5.5	7.9	-7.5
Red pepper leaf	<i>Capsicum annuum</i>	-0.8	7.0	14.6

Sample name		Inhibitory effect (%)		
Common name	Scientific name	Fr. I	Fr. IV	Fr. V
Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	-9.8	8.4	-11.4
Pine needles	<i>Pinus densiflora</i>	2.4	6.1	-14.3
<b>Green tea</b>	<i>Cinnamomum camphora</i>	23.6	29.5	12.0
Job's tears	<i>Coix lacryma-jobi var. ma-yuen</i>	-4.7	1.0	-5.2
Zandae	<i>Adenophora tryphilla var. japonica</i>	7.0	13.4	-6.3
Broccoli	<i>Brassica oleracea</i>	-12.7	-5.6	-2.8
Kale root	<i>Brassica oleracea</i>	-14.9	-13.6	-1.6
Corn salad	<i>Valerianella locusta</i>	-22.4	-16.1	-24.4
Doragi	<i>Platycodon grandiflorum</i>	-34.5	-10.2	-15.7
Day lily	<i>Hemerocallis aurantiaca</i>	-1.2	-3.2	-9.0
<b>Radish</b>	<i>Raphanus sativus</i>	12.5	34	21.6
Chicory	<i>Cichorium intybus L.</i>	-3.2	-11.3	-17.5
Hollyhock	<i>Althaea rosea Cav.</i>	-16.6	-11.3	-19.9
<b>Dried persimmons</b>	<i>Disopyrus kaki</i>	25.0	28.0	3.9
Wild rose	<i>Rosa rugosa</i>	18.3	26.5	-6.2
<b>Sansuyu</b>	<i>Comus officinalis</i>	28.1	16.4	13.2
Ginkgo	<i>Ginkgo biloba</i>	-8.0	12.0	3.5
<b>Pomegranate</b>	<i>Punica granatum</i>	35.3	38.0	29.0

Sample name		Inhibitory effect (%)		
Common name	Scientific name	Fr. I	Fr. IV	Fr. V
Moosoon	<i>Paphanus acanthiformis</i>	-17.0	0.6	-15.1
Plum	<i>Prnus mume Sieb. Et Zucc.</i>	-17.9	0.5	4.6
Honghwa	<i>Carthamus tinctorius</i>	2.4	-28.6	-6.9
Jandea	<i>Adenophora tryphilla var. japonica</i>	7.0	13.4	-6.3
Plantain	<i>Plantago asiatica</i>	-23.3	-9.2	-34.7
Gardenia seeds	<i>Gardenia jasminoides</i>	-2.0	-11.6	8.3
Yuza	<i>Citrus junos</i>	-6.7	12.0	-13.4
Endiv	<i>Cichorium endivia</i>	-22.4	-16.1	-24.4
Apricot	<i>Prunus armeniaca var. ansu</i>	18.1	-30.4	-13.9
Goandonghw	<i>Tussilago farfara L.</i>	0.2	-30.4	1.2
Clematis	<i>Akebia quinata</i>	-12.0	6.3	-5.4
Omija	<i>Schizandra chinensis</i>	2.1	-3.6	-33.3
Sweet flag	<i>Acorus calamus L.</i>	-9.0	-7.2	-7.4
Ginger	<i>Zingiber officinale</i>	-14.2	0.5	-2.0
Dedeg	<i>Codonosis lanceolata</i>	3.9	1.1	-16.4
Cactus	<i>Opuntia ficus-indica Mill. saboten Makino</i>	6.0	-3.3	-14.1
Mountain berries	<i>Rubus coreanus</i>	17.6	-4.8	6.1
Chinese bellflower	<i>Platycodon grandiflorum</i>	-34.5	-10.2	-15.7

Sample name		Inhibitory effect (%) <sup>a)</sup>		
Common name	Scientific name	Fr I <sup>b)</sup>	Fr IV <sup>c)</sup>	Fr V <sup>d)</sup>
<b>Persimmon leaf</b>	<i>Diospyros kaki</i>	26.9	-1.9	28.0
Licorice root	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	14.9	13.9	0.7
Chinese matrimony vine	<i>Lycium chinense</i>	12.6	-16.0	-9.7
Cinnamon bark	<i>Cinnamomu loureirii</i>	15.2	-12.0	14.9
<b>Orange peel</b>	<i>Citrus unshiu</i>	30.6	12.5	7.7
Milk vetch	<i>Astragalus membranaceus</i>	-1.4	27.3	14.8
<b>Danggui</b>	<i>Angelica gigas</i>	25.0	6.9	-2.8
Jujube	<i>Zizyphus jujuba var. inermis</i>	22.3	23.2	3.8
<b>Doochung bark</b>	<i>Eucommia ulmoides</i>	26.2	-4.4	-6.7
<b>Doochung leaf</b>	<i>Eucommia ulmoides</i>	30.0	8.3	-9.4
Dunggulae leaf	<i>Polygonatum japonicum</i>	-14.5	-4.6	-12.8
Dunggulae trunk	<i>Polygonatum japonicum</i>	-14.9	-2.4	-12.1
Wormwood	<i>Artemisia vulgaris</i>	-12.2	-19.2	-16.6
Cherokee rose	<i>Rosa laevigata Michx.</i>	4.6	17.6	5.2
Bangpung	<i>Sapohnikovia divaricata</i>	7.8	19.9	-16.1
Araliaceous shrubs root bark	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	6.3	-22.6	-19.3
Chinese quince	<i>Pseudocdonia sinensis</i>	1.2	-2.0	-6.1

## 2) Glucose uptake 저해활성 시료의 2차 검색

시료의 산지별, 계절별, 품종별 활성변화에 따른 시료선정의 정확성을 기할 목적으로 1차 검색시 활성이 높았던 시료를 대량 구입한 후 이들을 대상으로 2차 uptake 저해활성, transport 저해활성 및 BBMV에 의한 uptake 저해활성 등을 측정하였다. 즉 Caco-2 cell과 2-NBDG를 이용한 1차 glucose uptake 실험에서 높은 저해활성을 나타내었던 감잎 열수 추출획분, 석류 메탄올 추출획분, 래디쉬 메탄올 추출획분, 두충잎 냉수 추출획분을 대상으로 2차 활성검색을 실시한 결과 석류 메탄올 추출물이 가장 높은 저해활성을 나타내었다(Fig. 3-4-2). Transwell을 이용하여 glucose transport 실험을 실시한 결과 각 물질들의 glucose transport 저해활성은 1차 및 2차 glucose uptake 저해활성 실험에서와 유사한 경향을 보였다(Fig. 3-4-3). Fig. 3-4-4는 BBMV에 의한 glucose uptake 저해활성을 측정한 결과로 석류 메탄올 추출물이 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 또한 추출획분들의 SGLT1(sodium-dependent glucose transporter 1) 생합성에 미치는 영향을 검토하기 위해 ELISA를 이용하여 SGLT1의 생합성량을 측정한 결과, 래디쉬 다음으로 석류의 메탄올 추출물이 높은 억제활성을 나타내었다(Fig. 3-4-5). 이상의 Caco-2 및 BBMV에 의한 glucose uptake, glucose transport 및 ELISA에 의한 생합성 억제활성 등의 실험결과를 기초로 석류 메탄올 추출획분을 시료로 선정하였다.

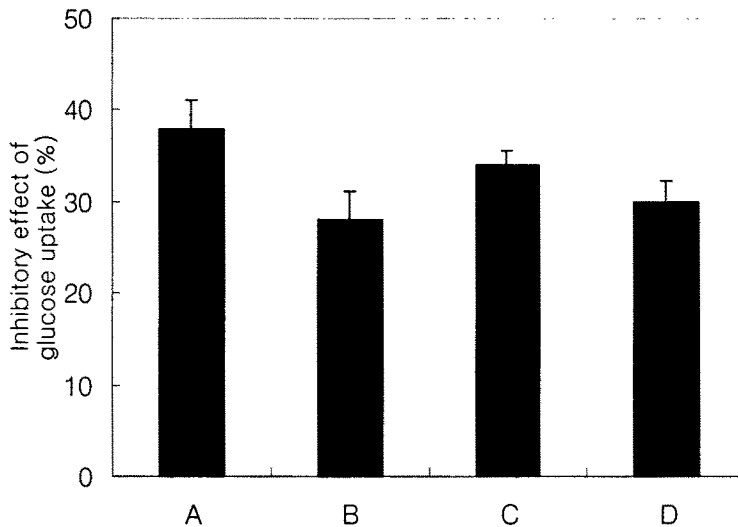
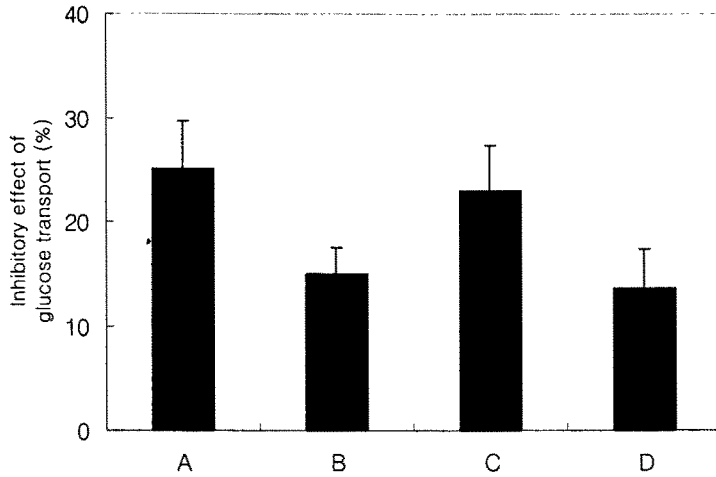


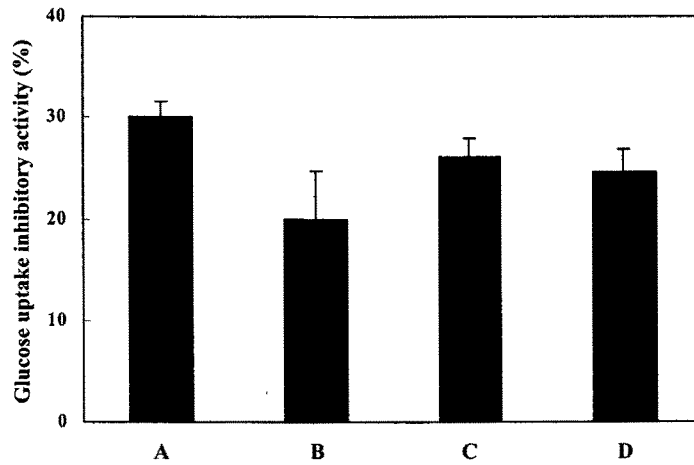
Fig. 3-4-2. Inhibitory effect of glucose uptake in Caco-2 cell.

A: 석류 메탄올 추출물 B: 감잎 열수 추출물 C: 래디쉬 메탄올 추출물 D: 두충잎 냉수 추출물



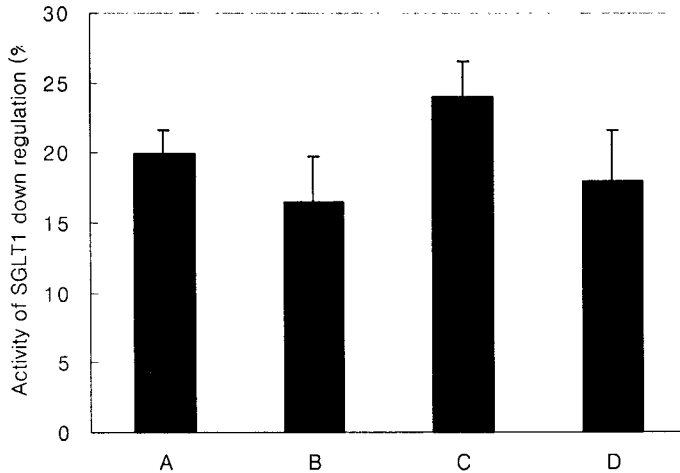
**Fig. 3-4-3. Inhibitory effect of glucose transport in Caco-2 cell.**

A: 석류 메탄올 추출물 B: 감잎 열수 추출물 C: 래디쉬 메탄올 추출물 D: 두충잎 냉수 추출물



**Fig. 3-4-4. Inhibitory effect of glucose uptake in mice intestinal BBMV assay system.**

A: 석류 메탄올 추출물 B: 감잎 열수 추출물 C: 래디쉬 메탄올 추출물 D: 두충잎 냉수 추출물



**Fig. 3-4-5. Detection of SGLT1 regulation activity in Caco-2 cell by enzyme-linked immunosorbent assay.**

A: 석류 메탄올 추출물 B: 감잎 열수 추출물 C: 레디쉬 메탄올 추출물 D: 두충잎 냉수 추출물

### 3) *In vivo*에서의 glucose uptake 저해활성

상기의 2차 *in vitro* glucose uptake 저해활성 검토와 동시에 4점의 시료를 대상으로 glucose uptake 관련 *in vivo* 실험을 실시함으로써 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 높은 저해활성을 갖는 시료를 최종시료로 선정하고자 하였다. 그 결과 당뇨유발 mouse는 4주간의 실험기간에서 100% 생존력 (Table 3-4-2)을 나타내었으며, 유의성있게 소장의 무게와 길이가 증가하였고 (Table 3-4-3), IPGTT (intraperitoneal glucose tolerance test) 결과는 Table 5-4에 나타난 바와 같이 석류 methanol 추출물 급여군은 당뇨유발 쥐와 석류 methanol 추출 급여 이외의 쥐들보다 유의적으로 낮은 값을 보였다. 뿐만 아니라 각 시료를 급여한 쥐의 소장으로부터 조제한 BBMV에 의한 glucose uptake 저해활성을 측정된 결과 대조군과 기타군보다 석류 methanol 추출물 급여군에서 높은 저해활성 값을 나타내었다 (Fig. 3-4-6).

Table 3-4-2. Survival rate of experimental mice orally administrated *Punica granatum*

	Dose (mg/kg)	No. of mice	No. of survival	Survival rate (%)
NC	-	8	8	100
DC	-	8	9	100
A	1,000	9	8	100
B	1,000	9	8	100
C	1,000	9	8	100
D	1,000	9	8	100

Table 3-4-3. Effect of *Punica granatum* on weight gain, energy intake, intestine in diabetic mice

Group	Water intake (ml/day)	Food intake (g/week)	Weight gain(g)	Intestinal weight (g)	Intestinal length (cm)
A	22.11 ± 2.2	38.41 ± 2.5	3.65 ± 2.61	0.66 ± 0.089	12.98 ± 1.56
B	27.85 ± 2.8	55.84 ± 4.5	-7.35 ± 6.0	1.33 ± 0.13	23.52 ± 2.63
C	24.12 ± 1.5	52.18 ± 1.3	-6.62 ± 1.65	1.46 ± 0.39	24.83 ± 3.71

A : Normal control

B : Diabetic control

C : *Punica granatum* methanol extract (1,000 mg/kg)



Table 3-4-4. Effect of several plants extracts on intraperitoneal glucose tolerance test in diabetic mice

	<sup>b)</sup> Blood glucose level (mg/dL)				
	0 min	30 min	60 min	90 min	140 min
NC	98±10	210±11	187±14	125±19	100±9
DC	300±23	382±21	410±18	380±23	320±21
A	305±21	340±12	363±14	312±17	298±19
B	290±22	370±19	359±24	340±27	321±20
C	240±15	338±19	350±20	310±11	305±10
D	238±17	298±10	350±20	320±16	313±19

Extracts of *Punica granatum*, *Diospyros kaki*, *Raphanus sativus* and *Eucommia ulmoides* were supplied in tap water (1,000 mg/kg) with normal feed for 4 weeks. Values were mean±S.D. of 8 ~9 mice in each group.

NC : Normal control mice

DC : Diabetic control mice

A : Diabetic mice supplied with methanol extract of *Punica granatum* (fruit)

B : Diabetic mice supplied with hot water extract of *Diospyros kaki* (leaf)

C : Diabetic mice supplied with methanol extract of *Raphanus sativus* (fruit)

D : Diabetic mice supplied with cold water extract of *Eucommia ulmoides* (leaf)

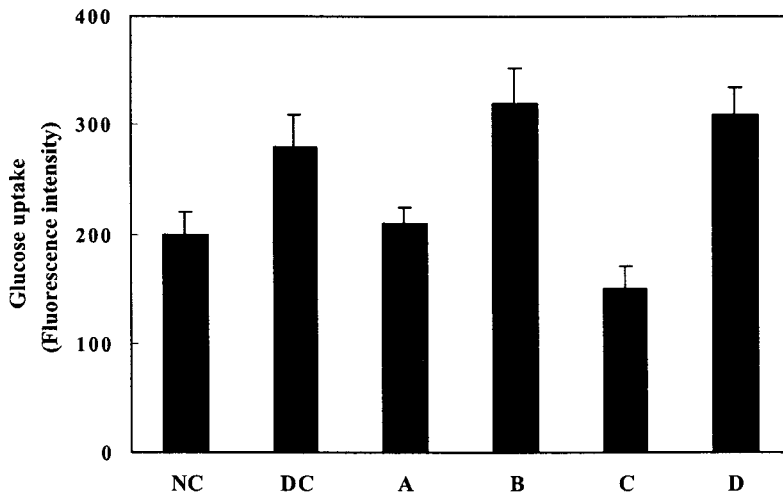


Fig. 3-4-6. Inhibitory effects of glucose uptake in intestinal BBMV from diabetic mice supplied with four kinds of extract for 4 weeks.

Extracts of *Punica granatum*, *Diospyros kaki*, *Raphanus sativus* and *Eucommia ulmoides* were supplied in tap water (1,000 mg/kg) with normal feed for 4 weeks. Values were mean±S.D. of 8 ~9 mice in each group.

NC : Normal control mice

DC : Diabetic control mice

A : Diabetic mice supplied with methanol extract of *Punica granatum* (fruit)

B : Diabetic mice supplied with hot water extract of *Diospyros kaki* (leaf)

C : Diabetic mice supplied with methanol extract of *Raphanus sativus* (fruit)

D : Diabetic mice supplied with cold water extract of *Eucommia ulmoides* (leaf)

#### 4) 선정된 식료 methanol 추출물의 *in vivo* 급성독성

최종 시료로 선정된 식료 methanol 추출물의 급성독성 여부를 알아보기 위해 추출물을 0, 500, 1,000, 1,500 mg/kg의 농도로 조제한 후 각 군당 8마리의 ICR mouse에 음용수의 형태로 3주동안 공급해 주면서 검토한 급성독성실험 결과, 모든 군에서 100%의 생존율을 보임으로써 식료 추출물에 의한 독성은 나타나지 않았다(Table 5-5). 이상에서와 같이 1, 2차 *in vitro* assay, *in vivo* assay 및 *in vivo* 급성독성실험의 결과들로부터 최종적으로 식료의 methanol 추출물을 glucose uptake 저해활성물질의 시료로 선정하였다.

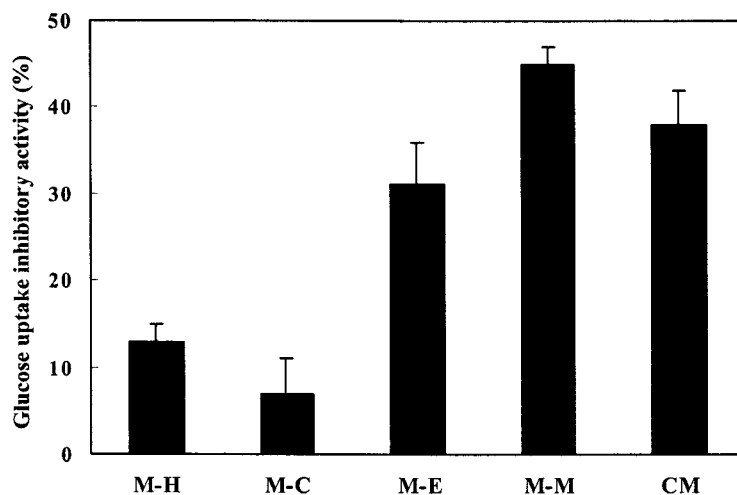
Table 5-5. Body weight and survival rate of mice orally administrated *Punica granatum* on acute toxicity

Group	No. of mice	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	No. of mice survived	Survival rate (%)
Control	8	30.12 ± 2.35	32.98 ± 2.16	8	100
500 mg/kg	8	29.43 ± 2.61	31.51 ± 3.24	8	100
1000 mg/kg	8	29.78 ± 3.55	30.97 ± 4.45	8	100
1,500 mg/kg	8	30.17 ± 3.23	31.25 ± 1.23	8	100

나. 석류 함유 glucose uptake 저해활성물질의 정제

1) 석류의 methanol 추출 및 유기용매 분획

Glucose uptake 저해활성 물질을 정제하기 위해 시료로 선정된 석류를 Scheme 3-4-4에 기술된 방법에 따라 대량추출을 실시하였다. 석류 2 kg을 methanol로 추출한 후, hexane, chloroform, ethylacetate로 분획하여 남은 잔사를 methanol 분획으로 하였다. 각 분획별로 glucose uptake 저해활성을 측정된 결과 Fig. 3-4-7에서와 같이 methanol 분획물, ethylacetate 분획물 순으로 높은 저해활성을 나타내었다.



**Fig. 3-4-7. Inhibitory activity of organic solvent extracts from *Punica granatum* on intestinal glucose uptake in Caco-2 cell assay system.**

Inhibitory activity on intestinal glucose uptake was determined according to the methods previously described in scheme 4. Final concentration of sample was 0.1 mg/mL. Data represent the mean (n=3)  $\pm$ S.D.

M-H : Hexane extract of *Punica granatum*

M-C : Chloroform extract of *Punica granatum*

M-E : Ethylacetate extract of *Punica granatum*

M-M : Methanol extract of *Punica granatum*

## 2) 1차 silica gel 60 open column chromatography

상기의 methanol 분획물을 chloroform과 methanol을 100 : 0부터 0 : 100으로 극성도를 10%씩 변화시키면서 각각 5 bed volume씩 stepwise로 용출시킨 후, 각 획분의 glucose uptake 저해활성 효과를 검토한 결과, chloroform : methanol = 80 : 20에서 가장 높은 glucose uptake 저해활성을 갖는 획분을 분리하였다 (Fig. 3-4-8).

### 3) 2차 silica gel 60 open column chromatography

분리된 활성획분을 chloroform과 methanol을 100 : 0, 85 : 15, 83 : 17, 80 : 20, 77 : 23, 75 : 25, 70 : 30, 0 : 100 순으로 용출하여 저해활성을 측정한 결과 chloroform : methanol = 80 : 20에서 가장 높은 glucose uptake 저해활성을 갖는 용출획분을 분리하였다(Fig. 3-4-9).

### 4) Prep-Thin layer chromatography

고활성 상기 획분을 ODS gel plate (20 × 10 cm)에서 methanol : water = 4 : 1의 전개용매로 Prep-TLC (thin layer chromatography)를 실시하여 5개의 획분으로 분리한 후 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 3-4-10과 같이  $R_f$ 치가 가장 작은 PG-1 획분이 가장 높은 저해활성을 나타내었다.

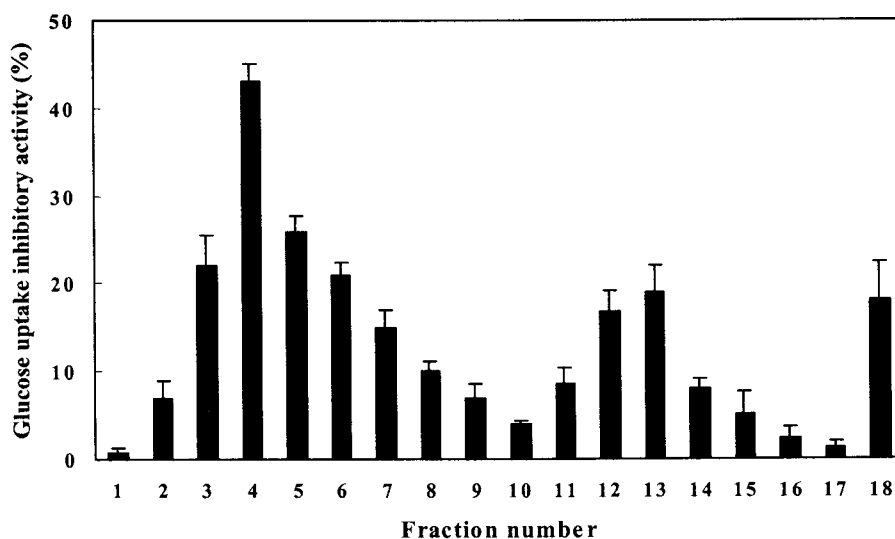
### 5) HPLC

분리된 활성획분을 C<sub>18</sub> column (Preparative HPLC, 7.8 × 300 mm)에 주입하고 MeOH : water = 95 : 5의 전개용매를 사용하여 3 ml/min의 유속으로 용출하여 활성획분만을 받아 농축한 후 2차 HPLC를 동일조건에서 실시한 결과 Fig. 3-4-11과 같이 비교적 순도가 높은 저해활성물질을 정제할 수 있었다.

Table 3-4-6은 석류 methanol 분획물로부터 정제 PG-1a 물질까지의 정제단계에 따른 수율과 IC<sub>50</sub>을 종합한 것으로 수율은 0.3%로 낮았지만 IC<sub>50</sub>값은 2.3배 감소한 56.2 μg/ml를 보임으로써 식품유래의 물질로서는 비교적 낮은 값을 나타내었다.

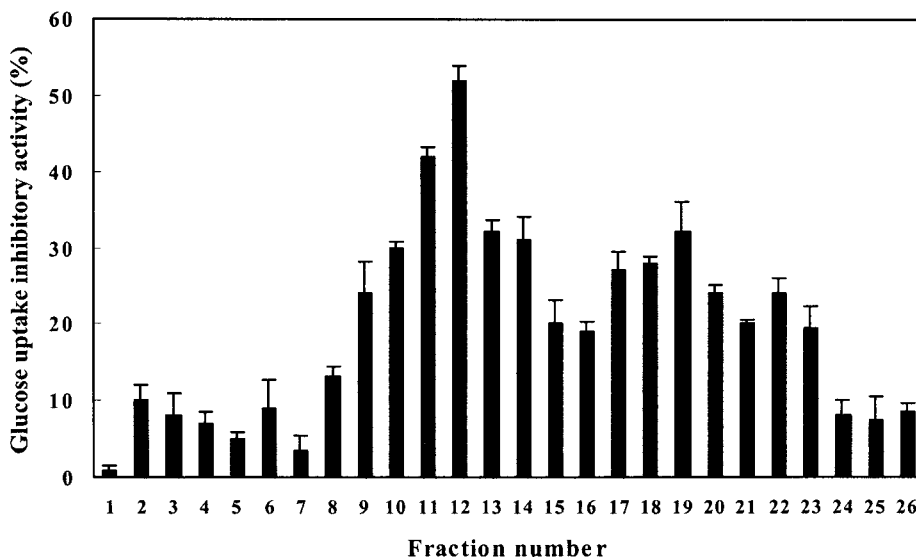
#### 다. 정제물질 PG-1a의 구조해석

정제물질 PG-1a 물질을 구조해석하기 위해 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, FAB-MS, EI-MS 등을 실시하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Fig. 3-4-12)은 7.7과 7.6 ppm의 aromatic proton과 0.8 ~ 1.7 ppm에서 치환된 aliphatic proton signal들을 보였으며, <sup>13</sup>C-NMR spectrum(Fig. 3-4-13)은 169.4 ppm의 ester carbonyl 탄소와 67.3 및 67.0 ppm에서 hydroxylated aliphatic 탄소 signal을 나타내었다. EI-MS와 FAB-MS spectrum은 [H+H]<sup>+</sup> 419 m/z와 [H+Na]<sup>+</sup> 441 m/z의 두 peak가 일치하였으며 EI-MS의 base peak (149 m/z)는 phthalic acid 잔기의 존재를 시사하면서 분자량 418의 물질임을 나타내었다. 또한 FeCl<sub>3</sub>, ninhydrin, bromocresol green 등에 의한 TLC 정색반응은 나타나지 않음으로써 정제 PG-1a의 구조를 phthalic acid의 diisononlyester 또는 hydroxyl alkyl ester로 추정할 수 있었다.



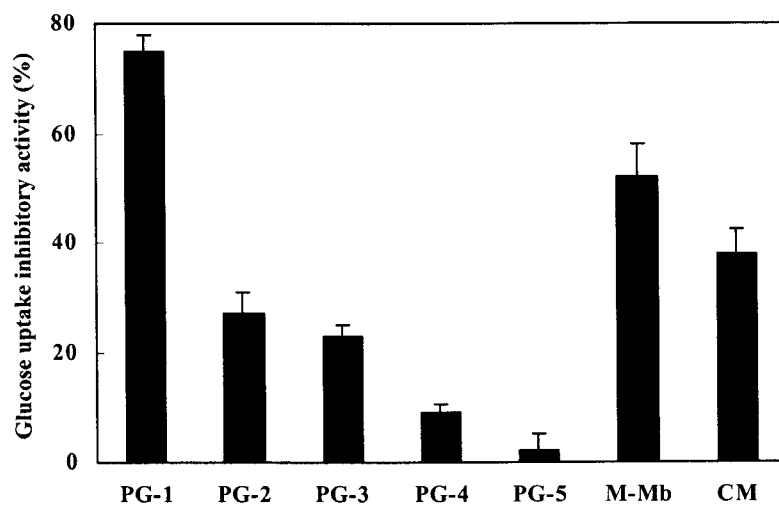
**Fig. 3-4-8.** Inhibitory effect of M-M subfractions eluted by the first silica gel open column chromatography on intestinal glucose uptake in Caco-2 cell assay system.

Inhibitory activity on intestinal glucose uptake was determined according to the methods previously described in scheme 4. Sample concentration was 0.1 mg/mL. Eluants were mixtures of CHCl<sub>3</sub> and MeOH (100:0 (Nos. 1-2), 80:20 (Nos. 3-5), 70:30 (Nos. 6-7), 60:40 (Nos. 8-9), 50:50 (Nos. 10-11), 40:60 (Nos. 12-13), 30:70 (Nos. 14-15), 20:80 (Nos. 16-17), 0:100 (No. 18); v/v). Data represent the mean (n=3) ±S.D.



**Fig. 3-4-9. Inhibitory effect of M-Ma subfractions eluted by the second silica gel open column chromatography on intestinal glucose uptake in Caco-2 cell assay system.**

Inhibitory activity on intestinal glucose uptake was determined according to the methods previously described in scheme 4. Sample concentration was 0.1 mg/mL. Eluants were mixtures of CHCl<sub>3</sub> and MeOH (100:0 (No. 1), 85:15 (No. 2), 83:17 (Nos. 3-8), 80:20 (Nos. 9-14), 77:23 (Nos. 15-20), 75:25 (Nos. 21-23), 70:30 (Nos. 24-25), 0:100 (No. 26); v/v). Data represent the mean (n=3) ±S.D.



**Fig. 3-4-10. Inhibitory effect of fractions isolated by the TLC on intestinal glucose uptake in Caco-2 cell assay system.**

TLC was carried out on ODS gel plate with methanol and water (4:1) solvent system and detected with UV lamp (256 nm). The concentration of sample was 0.1 mg/mL. Data represent the mean (n=3)  $\pm$ S.D.

PG-1 ~ PG-5 : Fractions of preparated by the thin layer chromatography

M-Mb : Active fraction obtained by the second silica gel open column chromatography

CM : Methanol extract of *Punica granatum*



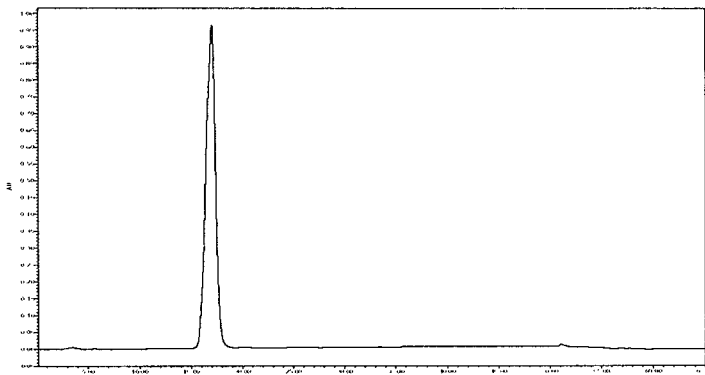


Fig. 3-4-11. HPLC analysis of the purified fraction, PG-1a, on symmetry C18 reverse column.

The HPLC analysis was performed with a Waters 2690 system equipped with a UV detector (at 228 nm). The column (7.8×300 mm) was eluted with the linear gradient of 90~100% methanol indistilled water at a flow rate of 2.0 mL/min. Injection volume was 60  $\mu$ l.

Table 3-4-6. Yield and IC<sub>50</sub> of intestinal glucose uptake inhibitor, PG-1a, isolated from *Punica granatum*

	Yield (%)	<sup>a)</sup> IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
Methanol extract (CM)	60	131.6
Fractionated methanol extract (M-M)	45	111.1
First silica gel (M-Ma)	17.8	116.3
Second silica gel (M-Mb)	7	96.2
Prep. TLC (PG-1)	2	66.7
Prep. HPLC (PG-1a)	0.3	56.2

a) IC<sub>50</sub> = The concentration required for 50% inhibition of intestinal glucose uptake

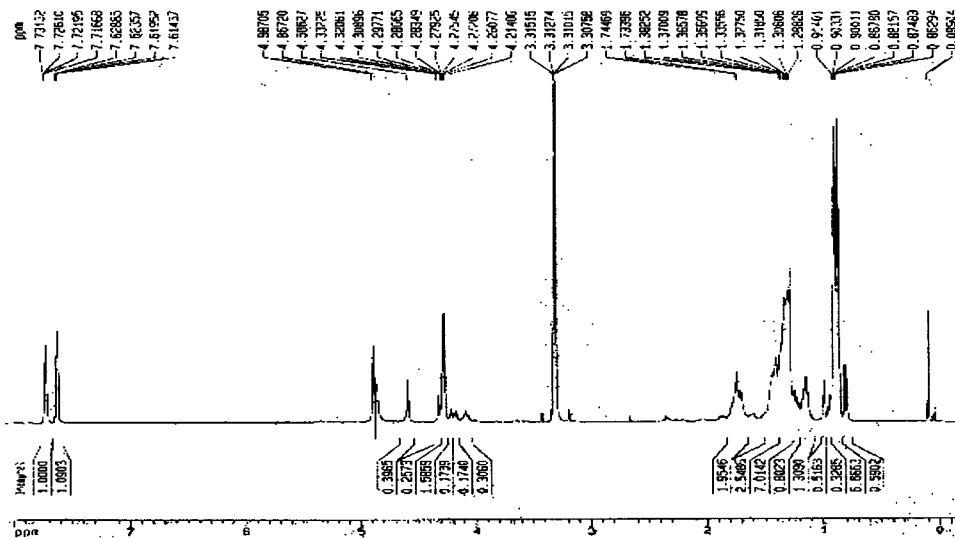


Fig. 3-4-12.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of intestinal glucose uptake inhibitor, PG-1a, isolated from *Punica granatum*.

PG-1a was dissolved in MeOD (methyl- $d_3$  alcohol- $d_1$ ) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-500, Bruker, German) operating at 600 MHz and 25°C.

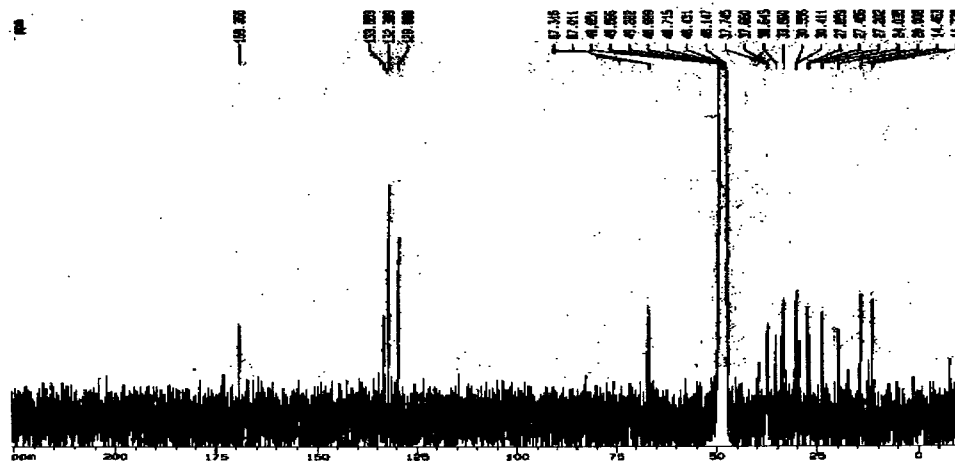


Fig. 3-4-13.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of intestinal glucose uptake inhibitor, PG-1a, isolated from *Punica granatum*.

PG-1a was dissolved in MeOD (methyl- $d_3$  alcohol- $d_1$ ) and recorded on high resolution NMR spectrometer (Avance-500, Bruker, German) operating at 500 MHz and 25°C.

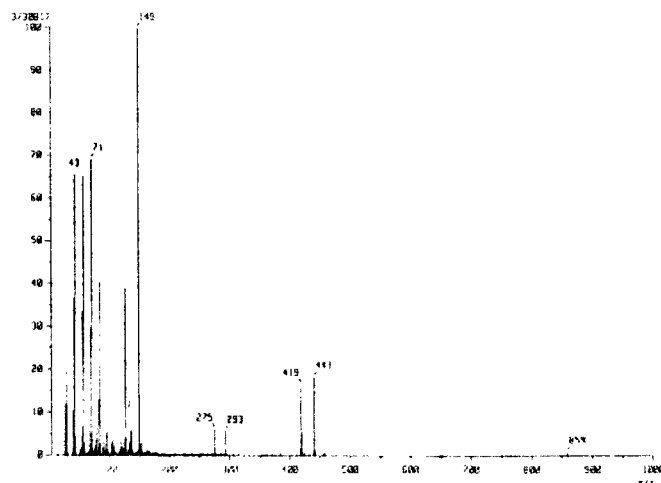
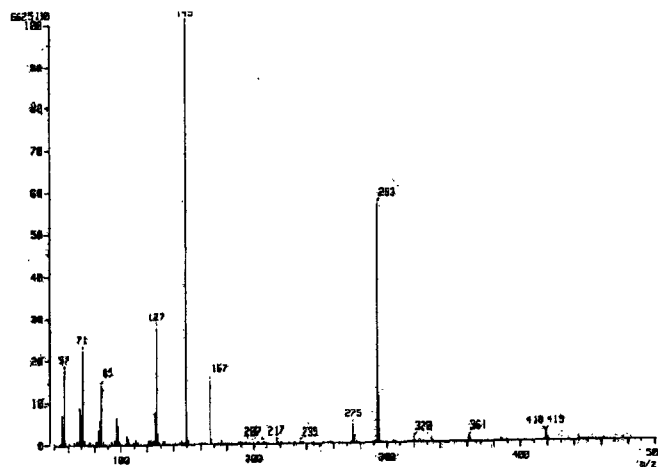


Fig. 3-4-14. EI-MS spectrum (A) and FAB-MS spectrum (B) of intestinal glucose uptake inhibitor, PG-1a, isolated from *Punica granatum*.

The spectrum was recorded on positive ion EI mass spectrometer and on positive ion FAB mass spectrometer (JMS-AX505WA, JEOL, Japan).

### 라. 석류로부터 분리된 PG-1a의 glucose uptake 저해활성

석류 methanol 추출물로부터 분리한 물질인 PG-1a의 저해활성 세기를 glucose 흡수저해제로 널리 알려진 phlorizin (0.1 mg/ml)과 비교함으로써 본 물질의 실용화 가능성을 검토하고자 하였다. 그 결과 Fig. 3-4-15와 같이 동일농도에서 정제물질이 약 10% 높은 저해활성을 나타냄으로써 향후 물질의 공업적 대량생산계 개발여하에 따라 비만·당뇨 예방용 glucose 흡수저해물질로서 높은 실용화 가능성을 시사하였다.

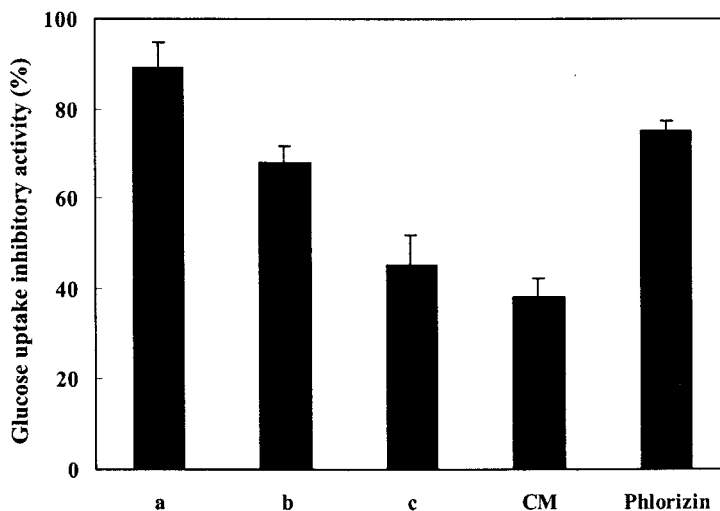


Fig. 3-4-15. Inhibitory activity of intestinal glucose uptake inhibitor, PG-1a, isolated from *Punica granatum* in Caco-2 cell assay system.

Inhibitory activity on intestinal glucose uptake was determined according to the methods previously described in scheme 4. Final concentrations of CM and phlorizin were 0.1 mg/mL. Data represent the mean (n=3)  $\pm$  S.D.

a : 0.1 mg/mL

b : 0.05 mg/mL

c : 0.02 mg/mL

CM : Methanol extract of *Punica granatum*

Phlorizin : Classical inhibitor of SGLT1

## 제 5절 식·약용 생물 자원 함유 미량 소재의 실용화

### 1. 서 설

식품 중에는 이미 알려져 있는 영양소 이외의 각종 생체 조절 기능성을 갖는 성분이 존재한다는 것이 판명되고 있다. 최근 질병 치료만을 목적으로 하는 현대 의료로만으로는 다종다양한 성인병과 암에 대해 효과적으로 대응할 수 없다는 판단에 따라 일상생활에서 질병을 예방하는 예방의학에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 식품에 의한 질병 예방은 식품이 갖고 있는 기능성에 대한 중요성을 더욱 크게 하고 있다.

일반적으로 기능성 인자는 미량으로 식품에 존재하기 때문에 그 효과를 충분히 발휘할 수 없다. 따라서 이것을 양적으로, 질적으로 증강 시키고 그 기능이 효과적으로 발현될 수 있도록 식품으로 만들어야 한다. 가장 간단한 방법은 식품 중 함유된 기능성인자의 양을 높은 순도로 분리, 정제 하는 것이다. 이 경우 식품 중에 있는 지질, peptide, polysaccharide, oligo 당 등은 기능성 식품으로 사용할 수 있으며, 그 또한 저해제, phytochemical 등의 물질은 의약품화 할 수 있다. 다른 방법은 농축으로 타 성분을 제거시켜 식품 내의 기능성 인자의 양을 증가시키거나 기능성 인자를 식품에 첨가하여 기능성이 강화된 식품을 설계할 수 있다. 또한 이들 못지않게 중요한 것은 기능성 인자들을 공업적으로 대량생산하고자 할 때 원료의 탐색과 확보로서 미사용 식용자원들의 이용 가능성에 대한 적극적 검토가 필요로 한다.

외국의 경우 cereal 제품에 미국 NCI의 연구결과를 표기한 것이 계기가 되어 1993년 'Nutrition Labeling and Education Act'를 작성, 공포하였다. 또한 7개 항목(지방식품과 심장혈관질환, 저지방식품과 암, 칼슘 고함유 식품과 골다공증, 저염식품과 고혈압, 식이섬유를 함유한 곡류제품, 과일, 야채와 암, 식이섬유 특히 수용성 식이 섬유를 함유한 곡물 및, 과일, 야채, 곡류제품과 심장관상동맥질환)에 대해 식품의 건강 강조 표시를 인가하였다. EU의 소비자들은 기능성 식품에 대해 식사의 일부로 천연 물질에서 유래하는 식품을 섭취함으로써 질병의 예방과 치료, 기타 의학상, 건강상에 이익을 가져온다는 개념으로 정제, 캡슐제의 사용보다는 식품이나 음료 등의 형태로 된 제품을 선호하고 있다. Pro-biotic 음료와 어유가 함유된 빵, 영양 드링크, 정신활성 드링크, 섬유분이 풍부한 빵, 우유, 칼슘강화 오렌지 주스, 우유, 요구르트 등이 대표적이다.

국내 기능성식품에 대한 연구는 식품 및 천연물 중 생체 조절기능성분에 대한 활성검사관계로 보고된 활성 물질은 고혈압 저해 및 억제제, 항암활성물질, 당뇨

개선물질, 뇌질환개선물질 등 여러 부분에 다양하게 있으나 기능성식품에 대한 시장도입이 활성화되어 있지 않으며 이를 위한 제도적 장치 또한 미비한 편이다. 현재 '건강보조식품'의 형태로 각종 생리활성이 표시된 제품들이 시판되고 있으나 기능성 식품에 따라 그 개념이 정립되어 있지 못한 상태이다.

본 연구에서는 이미 오랫동안 식용 또는 약용으로 사용하여 안정성이 검증된 천연 생물자원에서 각종 생리활성을 분석하고, 유효한 성분들을 분리하여 기능성 식품의 소재로 개발하고자 한다.

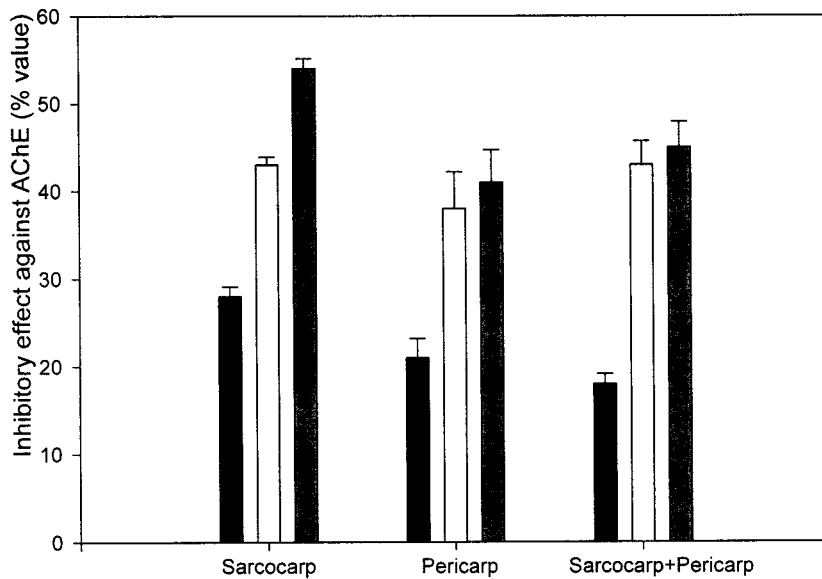
## 2. 선정 시료들로부터 생리 활성물질 추출 조건의 최적화 및 공업적 수준의 정제 방법 확립

### 가. 유자(*Citrus junos*)로부터 acetylcholinesterase inhibitor 성분의 공업적 추출 및 정제

전남 고흥산 유자 (*Citrus junos*) 20 kg으로부터 acetylcholinesterase inhibitor 성분을 공업적으로 대량 추출하기 위해 10 L용 steam jacket이 부착된 추출기를 사용하였다. 약 5배의 methanol로 16 시간 동안 4회 반복 추출하였고 그 결과 약 700 g의 수율을 획득하였으며 lab-scale 의 data와 크게 다르지 않는 저해 활성을 보였다 (Table 3-5-1). 다만 유자의 경우 과피가 전체무게의 약 55-60%를 차지하고 과육의 70-80% 이상을 수분이 함유되어 있기 때문에 생 유자 20 kg으로부터 추출된 활성성분의 수율은 약 4%에 불과했다. 또한 과육과 과피 그리고 과육/과피 혼합물을 각각 methanol로 추출하여 저해 활성을 측정 한 결과 과육 추출물에서 더 높은 저해 활성을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3-5-1).

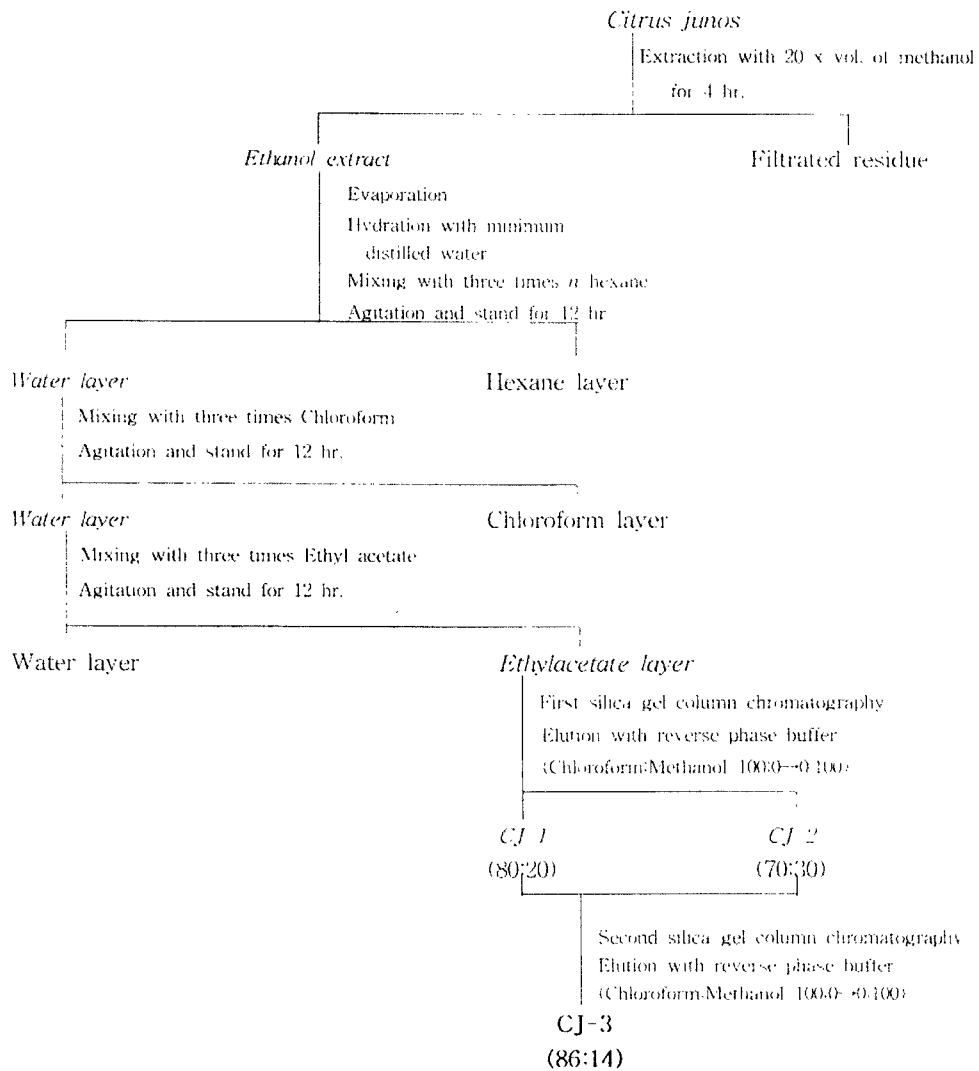
Table 3-5-1. Inhibitory effect of *Citrus junos* methanolic extract against acetylcholinesterase.

	Sample conc. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	90 $\mu\text{g}/\text{ml}$	130 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Lab scale	25 %	43 %	54 %
Bench scale	23 %	45 %	55 %



**Fig. 3-5-1. Inhibitory effect of *Citrus junos* against acetylcholinesterase. The percentage activity value for each section was calculated as compared to the control activity (100%). Sample concentration was 50, 90, 130  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. Values present the means ( $n=2$ )  $\pm$ S.D.**

\* 공업적 순도의 정제 공정



Scheme 3-5-1. Purification procedure of acetylcholinesterase inhibitors for industrial purity from *Citrus junos*.



나. 대추로부터 choline acetyltransferase 활성 성분의 공업적 추출 및 정제

경남 밀양산 *Zizyphus jujuba* (대추)로부터 choline acetyltransferase 활성물질의 공업적 추출조건을 다음과 같이 검토하였다. 시료 10 kg에서 seed를 제거하고 blader mixer로 미세하게 분쇄한 후 상기의 추출기를 사용하여 약 5 배의 methanol로 4 시간씩 4회 반복 추출하였고 그 결과 약 1.5 kg의 수율을 획득하였으며 lab-scale의 data의 활성 수율 비교를 와 크게 다르지 않는 활성을 보였다. 한편 온도별, 추출 시간별로 추출한 후 choline acetyltransferase activation에 대한 추출 조건을 검토한 후 실험실적 방법과 비교하였다. 그 결과 추출시간의 영향은 4 hr에서 가장 높았으나 온도의 영향은 초기 추출율에 다소 영향을 주었고 활성에서의 변화도 미비하였다 (Table 3-5-2, 3, 4). 이는 heating이 활성에 미치는 영향이 미비하므로 공업적 추출 방법에 있어서 불필요한 에너지를 절감할 수 있음을 알 수 있었다.

Table 3-5-2. Activation effect of *Zizyphus jujuba* methanolic extract on choline acetyltransferase

	Sample conc.100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	150 $\mu\text{g}/\text{ml}$	250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Lab scale	26 %	37 %	47 %
Bench scale	23 %	40 %	48 %

Table 3-5-3. Effect of extraction temperature on choline acetyltransferase activity

	20 $^{\circ}\text{C}$	30 $^{\circ}\text{C}$	50 $^{\circ}\text{C}$
Lab scale	39 %	46 %	45 %
Bench scale	40 %	47 %	47 %

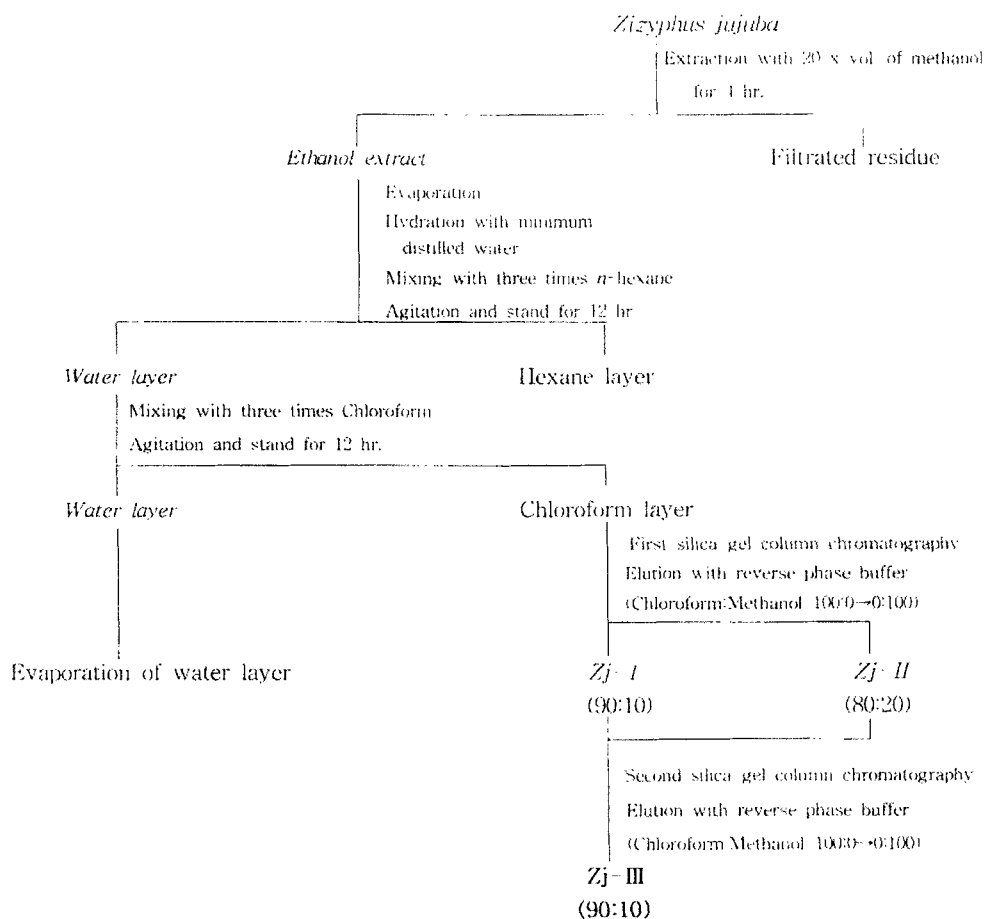
\* Sample concentration was 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$

Table 3-5-4. Effect of extraction time on choline acetyltransferase activity

	1 hr	2 hr	4 hr
Lab scale	21 %	35 %	47 %
Bench scale	30 %	37 %	49 %

\* Sample concentration was 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$

\* 공업적 순도의 정제 공정



Scheme 3-5-2. Purification procedure of cholineacetyltransferase activator for industrial purity from *Zizyphus jujuba*.

**다. 두층으로부터 MMP-1 억제활성 성분의 공업적 추출 및 정제**

**1) 두층 함유 MMP-1 억제활성물질의 공업적 추출조건 확립**

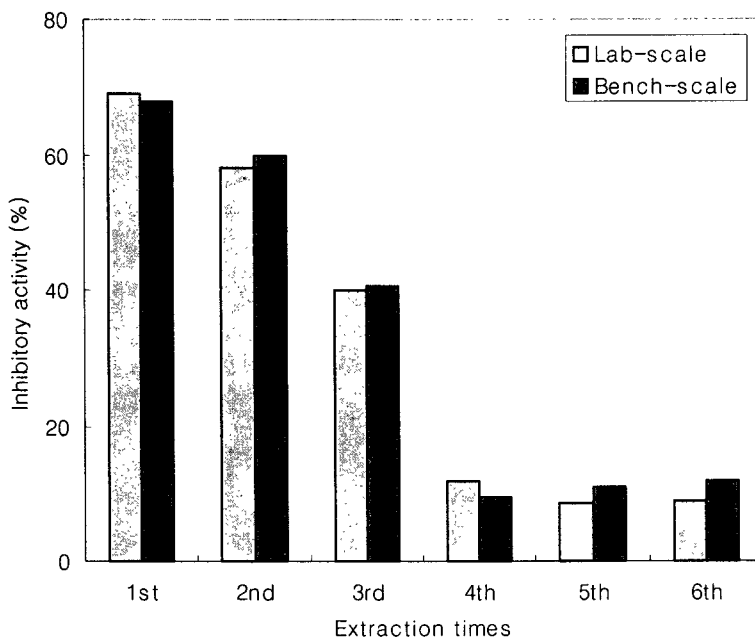
두층으로부터 MMP-1 억제활성물질의 공업적 추출조건을 최적화하기 위해 70% methanol과 5 L용 bench-scale의 추출기 및 0.5 L용 lab-scale의 환류 추출기를 사용하여 추출온도별, 추출시간별, 추출회수별 조건에 따른 억제활성 및 추출고형물량을 Lab-scale과 비교 검토함으로써 bench scale의 공업적 추출조건을 확립하고자 하였다. Table 3-5-5에 나타난 바와 같이 Lab-scale과 bench-scale 모두 60℃에서 추출물 중량당 MMP-1 억제활성이 가장 높았으며 추출 수율은 온도증가에 따라 증가하는 경향을 보였다. 추출온도 60℃에서 추출시간별 저해활성을 측정된 결과 bench-scale은 40분 이상에서 Lab-scale은 60분 이상에서 저해활성 증가는 나타나지 않았으며 Lab-scale보다 bench-scale 경우가 추출고형물량 및 억제활성이 다소 우수함을 보였다(Table. 3-5-6). 추출온도와 추출시간을 각각 60℃와 60분으로 고정시키고 추출회수별 잔여저해활성을 측정된 결과 Fig. 3-5-2에서와 같이 첫회 추출이 가장 높았으며 2회는 1회의 80%, 3회는 55%, 4회 이후에는 20% 이하를 나타냄으로써 최적 추출회수는 3회임을 알 수 있었다. 이상의 bench-scale의 추출조건들은 Lab-scale에 비해 큰 차이를 보이지 않음으로써 bench-scale의 최적 추출조건으로 추출온도 60℃, 추출시간 60분 추출회수 3회 등을 확립할 수 있었다.

**Table 3-5-5. Effects of extraction temperature on MMP-1 inhibitory effect and extracted solid amount**

	40℃	50℃	60℃	70℃
Inhibitory effect (%)				
Lab-scale	52.1	60.5	68.9	64.3
Bench-scale	52.5	64.6	70.2	67.5
Solid (kg)				
Lab-scale	0.18	0.21	0.25	0.30
Bench-scale	2.24	2.31	2.96	3.25

**Table 3-5-6. Effects of extraction time on MMP-1 inhibitory effect with 60°C methanol**

	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Inhibitory effect (%)					
Lab-scale	58.6	69.2	68.8	69.5	69.0
Bench-scale	69.8	71.5	72.1	71.8	71.2
Solid (kg)					
Lab-scale	0.25	0.28	0.31	0.33	0.34
Bench-scale	2.72	3.06	3.21	3.57	3.82



**Fig. 3-5-2. Effects of serial extraction on MMP-1 inhibitory effect with 60°C methanol at condition of every 60 min per a serial extraction.**

## 2) 저해활성물질의 공업적 순도 수준의 부분정제법 확립

### 가) 두층 methanol 추출물의 유기용매 분획

부분정제의 첫 번째 단계로 두층 70% methanol 추출물 중에 함유되어 있는 hexane과 ethylacetate 가용성 불순물을 제거하고자 유기용매 분획을 실시하였다. 그 결과 Fig. 3-5-3에서와 같이 대부분의 활성성분이 methanol로 분획됨을 알 수 있었으며 hexane 및 ethylacetate 분획내 함유된 저해활성물질은 미미하였다.

### 나) Methanol 분획물의 탈색

내구성이 강하고 저가인 탈색용 resin으로 Diaion HP-20, HP-21 및 활성탄을 사용하여 batch type과 column type에서 상기 분획물의 탈색효과를 검토한 결과 Diaion HP-21이 가장 우수하였으며 column type이 batch보다 약 8% 이상 탈색효과를 나타내었다(Table 3-5-7, 8).

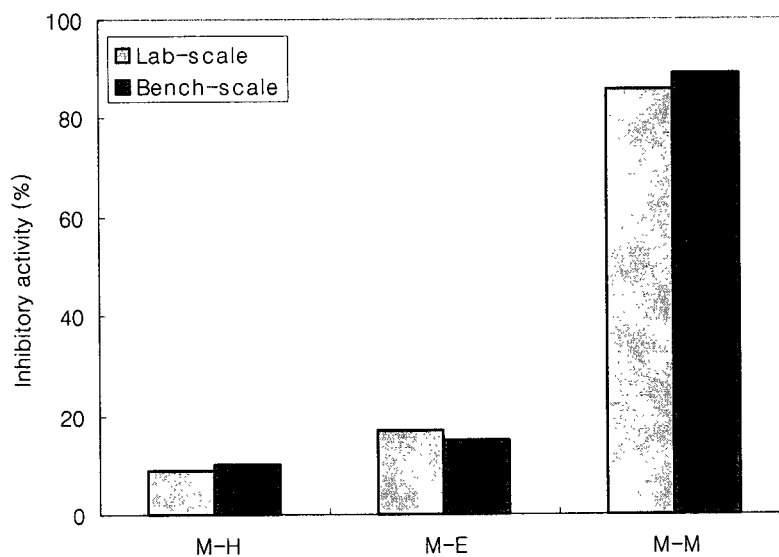


Fig. 3-5-3. MMP-1 inhibitory activities of organic solvent fractions from methanol extract.

M-H : Hexane soluble fraction

M-E : Ethylacetate soluble fraction

M-M : Methanol soluble fraction

**Table 3-5-7. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in batch type treatment**

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Eucommia ulmoides</i>	62.44	68.17	52.29

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

**Table 3-5-8. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in open column type treatment**

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Eucommia ulmoides</i>	67.67	73.12	57.36

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

#### 다) Ultrafiltration

분자량별 여과막 column과 Millipore masterflex를 사용하여 ultrafiltration을 실시함으로써 신속, 간편한 부분 정제공정을 개발하고자 하였다. 그 결과 분자량 1,000 MW-cut off 여과막을 통과한 여액이 전체 저해활성의 94% 이상 함유하였고 고형물 또한 91%를 나타냄으로써 이전 단계들에 의해 주로 저분자 물질들이 추출 또는 분획되었음을 알 수 있었고 이에 따라 ultrafiltration에 의한 부분 정제도는 크게 높지 않을 것으로 사료되었다(Data 제시하지 않음).

#### 라) Diaion HP-20 column chromatography

부분정제의 최종단계로 Diaion HP-20을 이용하여 column chromatography를 실시함으로써 정제와 탈색을 동시에 도모하고자 하였다. 물에 녹인 상기의 활성획분을 물로 평형화시킨 column에 주입하고 물로 세척한 후 stepwise로 20%, 60%, 100%의 methanol로 용출한 결과 Fig. 3-5-4과 같이 100% methanol 용출획분이 0.1 mg/ml의 assay계 농도에서 약 90% 내외의 높은 MMP-1 억제활성을 나타내었다. 한편 각 용출획분의 고형물량을 측정된 결과 전체 고형물량 중 약 60%가 60% methanol 용출획분에, 20% 내외가 20% methanol 용출획분에, 약 10%가 100% methanol 용출획분에 존재함으로써, 억제활성과 비교 검토할 때 매

우 높은 부분 정제도를 나타내었다.

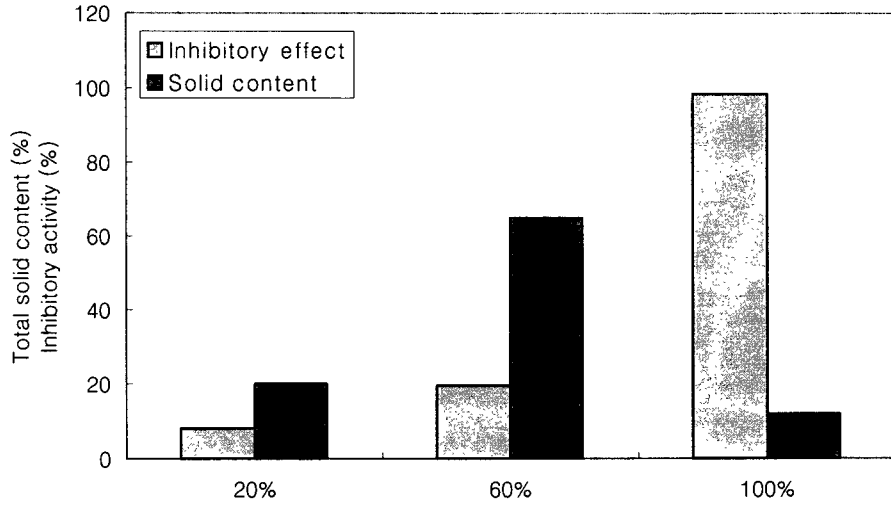


Fig. 3-5-4. MMP-1 inhibitory effects of methanol fractions eluted from Diaion HP-20.

\* 공업적 정제법 확립

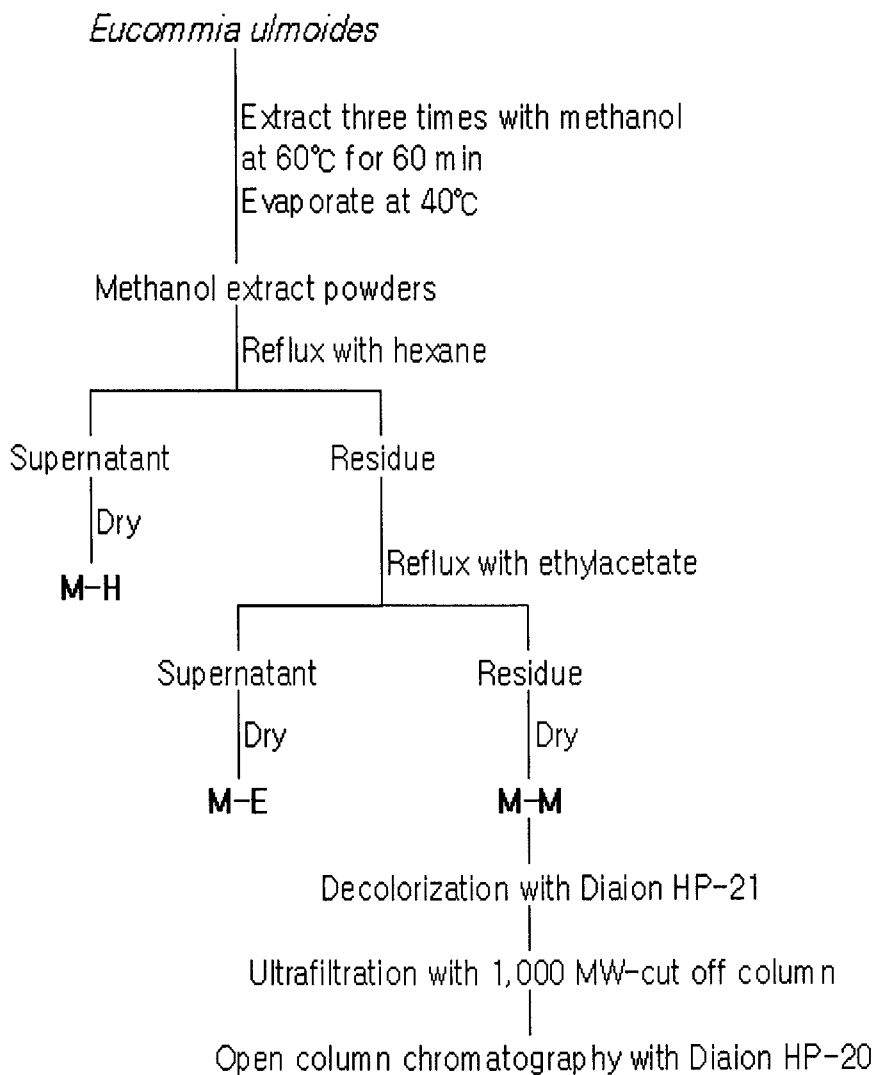


Fig. 3-5-5. Flow sheet for partial purification of MMP-1 inhibitory component from *Eucommia ulmoides*.



라. 석류로부터 **glucose uptake** 저해활성물질의 공업적 추출 및 정제

1) 석류 함유 **glucose uptake** 저해활성물질의 공업적 추출조건 확립

석류로부터 **glucose uptake** 저해활성물질의 공업적 추출조건을 최적화하기 위해 5 L용 bench-scale의 추출기와 0.5 L용 Lab-scale의 환류 추출기를 사용하여 70% methanol로 온도별, 시간별, 회수별 추출조건에 따른 활성을 비교 검토함으로써 bench scale의 공업적 추출조건을 확립하고자 하였다.

Table 3-5-9에 나타난 바와 같이 Lab-scale과 bench-scale 모두 60℃에서 추출물 중량당 **glucose uptake** 저해활성이 가장 높았으며 추출 수율은 온도증가에 따라 증가하는 경향을 보였다. 추출온도 60℃에서 추출시간별 저해활성을 측정한 결과 bench-scale은 40분 이상에서 Lab-scale은 60분 이상에서 저해활성 증가는 나타나지 않았으며 교반장치가 부착된 bench-scale 경우가 우수함을 보였다(Fig. 3-5-6). 추출온도와 추출시간을 각각 60℃와 60분으로 고정시키고 추출회수별 잔여저해활성을 측정한 결과 Fig. 3-5-7에서와 같이 첫회 추출이 가장 높았으며 2회는 1회의 70%, 3회는 40%, 4회 이후에는 20% 이하를 나타냄으로써 최적 추출회수는 2회임을 알 수 있었다. 이상의 bench-scale의 추출조건들은 Lab-scale에 비해 큰 차이를 보이지 않았고 최적 추출조건으로 추출온도 60℃, 추출시간 60분 추출회수 2회 등을 확립하였다.

**Table 3-5-9. Effects of extraction temperature on glucose uptake inhibitory effect and extracted solid amount**

	40℃	50℃	60℃	70℃
<b>Inhibitory effect (%)</b>				
Lab-scale	22.4	30.9	38.3	34.1
Bench-scale	22.7	32.1	40.2	37.8
<b>Solid (kg)</b>				
Lab-scale	0.23	0.25	0.29	0.34
Bench-scale	2.7	2.9	3.2	3.6

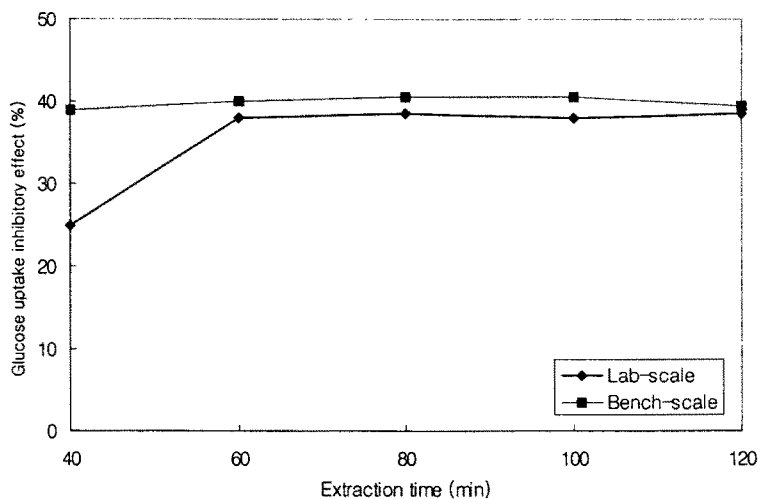


Fig. 3-5-6. Effects of methanol extraction time on glucose uptake inhibitory effect at 60°C.

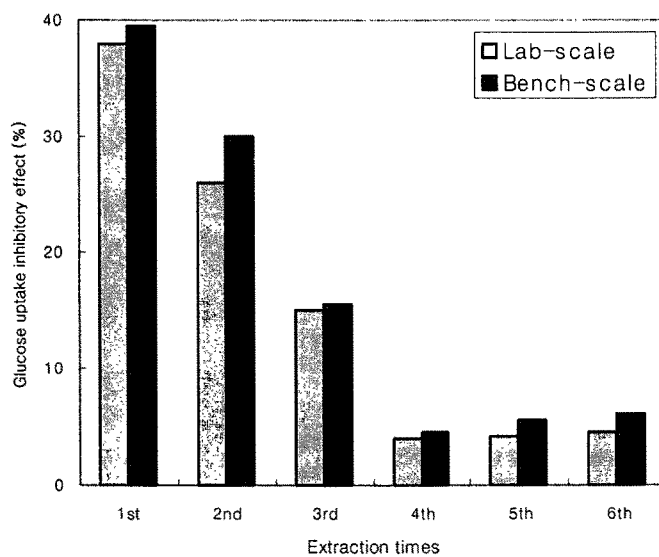


Fig. 3-5-7 Effects of serial methanol extraction on glucose uptake inhibitory effect with 60°C methanol under condition of every 60 min per a serial extraction at 60°C.

## 2) 저해활성물질의 공업적 순도 수준의 부분정제법 확립

### 가) 석류 methanol 추출물의 유기용매 분획

석류 70% methanol 추출물 중에 함유되어 있는 hexane과 acetone 가용성 불순물을 제거함으로써 부분정제의 정제도를 높이고 정제를 용이하게 하기 위해 유기용매 분획을 실시하였다. 그 결과 Fig. 3-5-10에서와 같이 대부분의 활성성분이 methanol로 분획됨을 알 수 있었으며 hexane 및 acetone 분획내 함유된 저해활성물질은 미미하였다.

### 나) Methanol 분획물의 탈색

비교적 저가이면서 내구성이 강한 탈색용 resin인 Diaion HP-20, HP-21 및 활성탄을 사용하여 batch와 column에서 methanol 분획물의 탈색효과를 검토한 결과 Diaion HP-21이 가장 우수하였으며 column type이 batch보다 약 10% 이상 높은 탈색효과를 나타내었다(Table 3-5-10, 11).

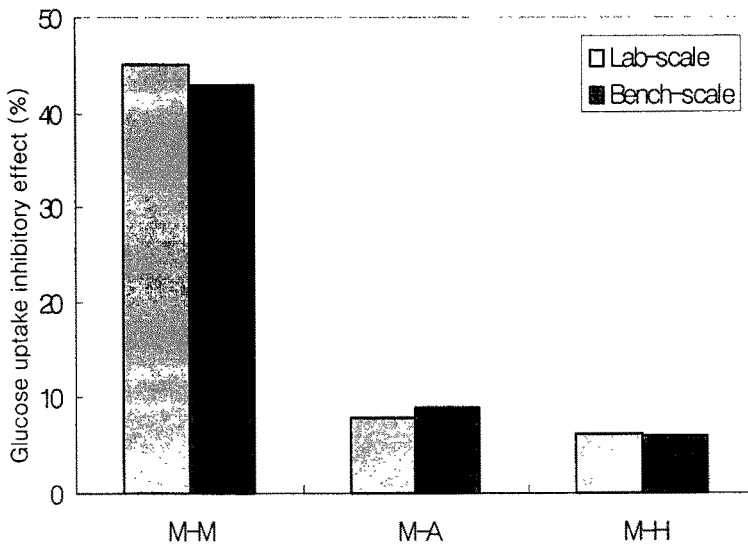


Fig. 3-5-10. Glucose uptake inhibitory activities of organic solvent fractions from methanol extract.

M-M : Methanol soluble fraction

M-A : Acetone soluble fraction

M-H : Hexane soluble fraction

**Table 3-5-10. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in batch type treatment**

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Punica granatum</i>	59.27	65.45	49.63

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

**Table 3-5-11. Effects of resins on L-value of crude samples prepared by the above extraction methods in open column type treatment**

	Diaion HP-20	Diaion HP-21	Active carbon
<i>Punica granatum</i>	67.15	74.37	58.48

Concentration of crude samples : 1,000 mg/L

#### 다) Ultrafiltration

Millipore masterflex와 분자량별 여과막 column을 사용하여 ultrafiltration을 실시함으로써 신속하고 간편한 부분 정제공정을 개발하고자 하였다. 그 결과 분자량 1,000 MW-cut off 여과막을 통과한 여액이 전체 저해활성의 92% 이상 함유하였고 고형물 또한 89%를 나타냄으로써 이전 단계들에 의해 주로 저분자 물질들이 추출 또는 분획되었음을 알 수 있었다(Data 제시하지 않음).

#### 라) Diaion HP-20 column chromatography

부분정제의 최종단계로 탈색처리에서 사용한 바 있는 Diaion HP-20을 이용하여 column chromatography를 실시함으로써 정제와 탈색을 동시에 도모하고자 하였다. 물에 녹인 상기의 활성획분을 물로 평형화시킨 column에 주입하고 물로 세척한 후 stepwise로 50%, 80%, 100%의 methanol로 용출한 결과 Fig. 3-5-11와 같이 100% methanol 용출획분이 0.1 mg/ml의 assay계 농도에서 약 80% 내외의 높은 저해활성을 나타내었다. 이상의 부분정제 공정을 종합하면 Fig. 3-5-12과 같다.

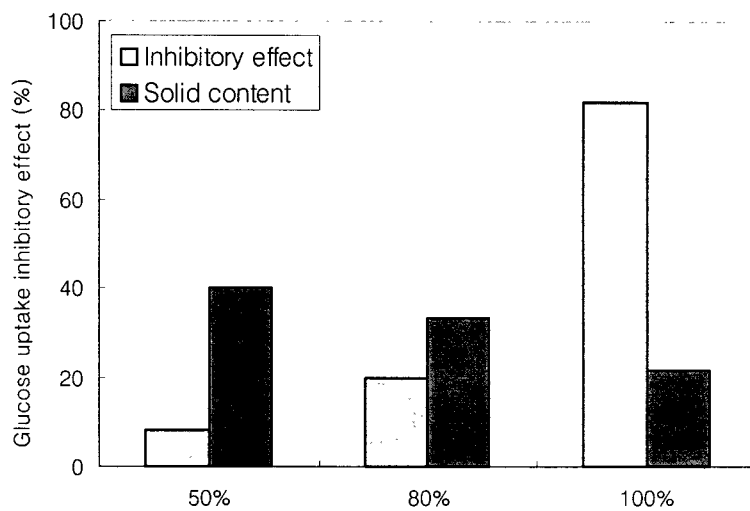


Fig. 3-5-11. Glucose uptake inhibitory effects of methanol fractions eluted from Diaion HP-20.

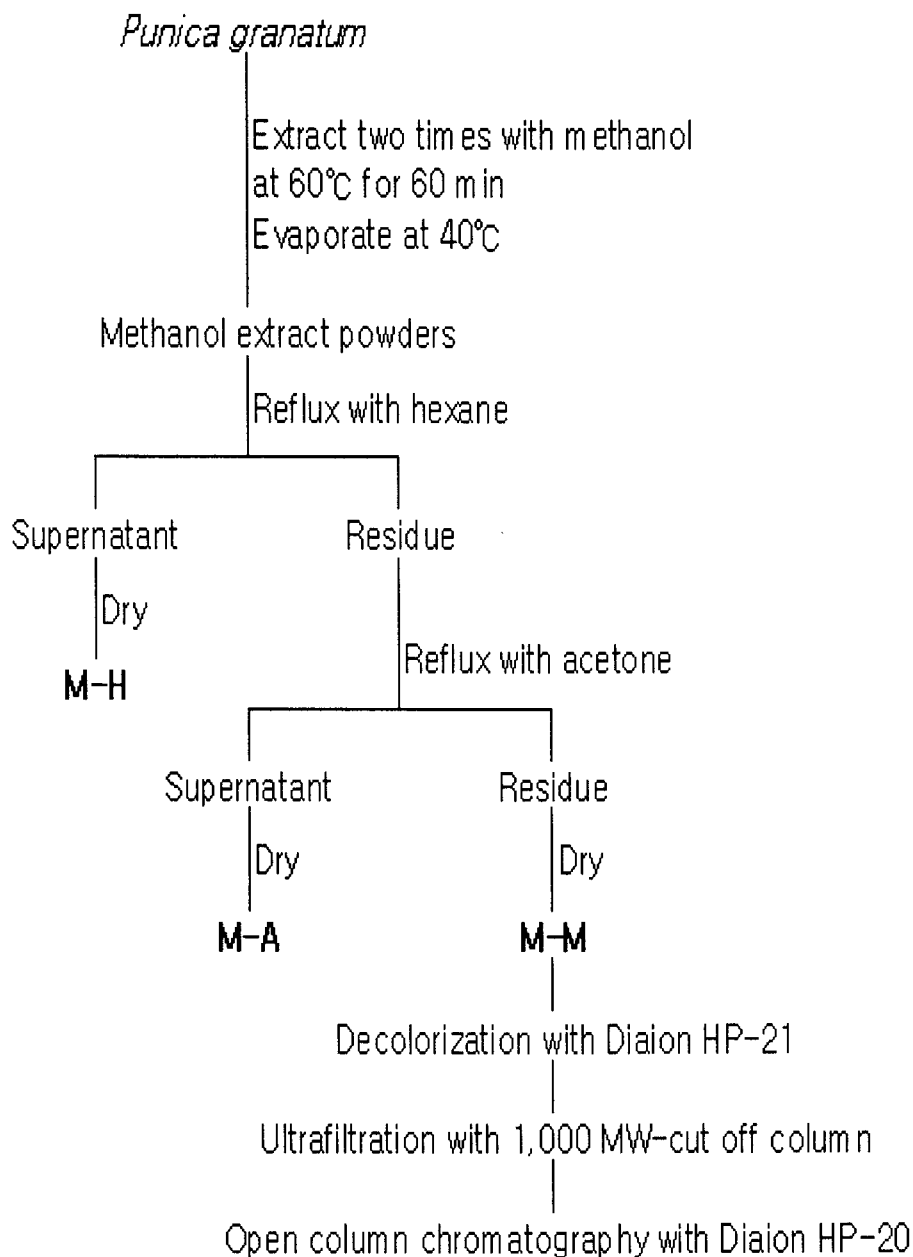


Fig. 3-5-12. Flow sheet for partial purification of active component from *Punica granatum*.

## 제 6절 식·약용 함유 생리활성 물질의 기능성 식품화

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 드링크제 제작

유자, 대추, 두충, 석류의 추출 분말의 이용하여 100 ml용 내용액 제제를 만들었다 제제의 맛, 향, 안정성 등을 고려하여 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상 과당, 올리고당, 벌꿀 등을 사용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨을, 산미제 및 pH조절제로 구연산을 사용하였다. 항산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였다. 그 외 식미 향상을 위해 사과과즙 같은 과일과즙을 혼합해 준다. 주 성분의 배합은 100 mg 으로 하여 조제 하였다.

#### 나. 연질 캡슐 제작

유자, 대추, 두충 석류의 추출 분말 100 mg에 소맥 배아유를 30-50%, 미강 추출물10-20%, 베타카로틴 1-3%, 레시틴 1-2%, 토코페롤 1% 등을 부형제로 사용하고, 맛을 고려하여 생강추출물, 계피분 등의 각종 추출물을 미량 첨가하였다 (Table 4-12).

#### 다. 과립제 제제

유자, 대추, 두충, 석류의 추출 분말 300 mg에 부형제로 유당 700 mg, 옥수수 전분3.5 mg, 산미제로 구연산 5 mg을 혼합하고 spray dry 한 후 제과 하였으며 함습도를 시험한 후 정립하고 최종 혼합하였다.

### 2. 결 과

#### 가. 드링크제 제작

유자, 대추, 두충, 석류의 추출 분말을 이용하여 100 ml 용 내용액제제를 제작하였다 제품의 향, 맛, 안정성 등을 고려하여 3가지 정도의 배합을 만들었다. 재료 및 방법에서와 같이 감미제로 D-sorbitol, 포도당, 액상 과당, 올리고당, 벌꿀 등을 사용하였으며 교미제로서 식염, 호박산나트륨 또는 L-글루타민산나트륨을, 산미제 및 pH조절제로 구연산을 사용하였다. 항산화제로 비타민 C와 방부제로 안식향산나트륨을 첨가하였다. 그 외에 식미의 향상을 위해 사과과즙, 배과즙 등을 혼합 하였다. 주성분의 배합은 100 mg으로 조제하였다 (Table 3-6-1).

**Table 3-6-1. 기능성 드링크 제제의 배합예**

배합예 1.

용량: 100 mL 제품유형: 내용액제제  성분: 분말소재 100 mg 백당 8.8% 포도당 5.8% 식염 0.05% 호박산이나트륨 0.05% 구연산 0.08% 안식향산나트륨 0.01% 에탄올 0.001% 니코틴산아미드 0.01%
--

배합예 2.

용량: 100 mL 제품유형: 과즙희석음료  성분: 식류 분말소재 100 mg 사과과즙 10% 대추즙 1% 배과즙 3% 벌꿀 0.5% 구연산 0.05% 비타민 C 0.05% 비타민 B6 염산염 0.01% L-글루타민산나트륨 0.01% 니코틴산아미드 0.01% 액상과당 0.01% 안식향산나트륨 0.01%
--





**나. 연질 캡슐 제작**

유자, 대추, 두충, 석류의 추출분말 100 mg을 이용하여 연질 캡슐을 제작하였으며 제품의 향, 맛 등을 고려하여 제작하였다(Table 3-6-2). 부형제로써 소맥 배아유를 30-50%, 미강 추출물 10-20%, 베타카로틴 1-3%, 레시틴 1-2%, 토코페롤 1% 등을 사용하였고, 맛을 고려하여 생강추출물, 계피분등의 각종 추출물을 미량 첨가하였다.

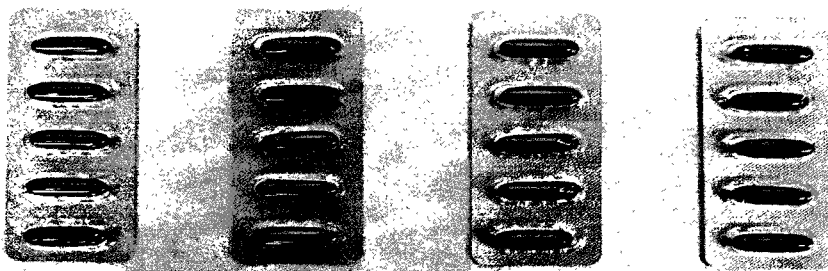
**Table 3-6-2. 기능성 연질 캡슐 제제의 배합 예**

배합 예 1.

단위: 1 Cap 제품유형: 건강보조식품(연질캡셀) 성분: · Extract 소재 100 mg · 소맥배아유 30% · 미강유 20% · 대두박 추출물 3% · D-α-토코페롤 1% · 베타카로틴 3% · 레시틴 1% · 계피분, 생강추출물 기타. 권장섭취량 및 섭취방 · 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능
--

배합 예 2.

단위: 1 Cap 제품유형: 건강보조식품(연질캡셀) 성분: · 분말소재 100 mg · 소맥배아유 50% · 미강추출물 10% · 베타카로틴 3% · 레시틴 2% · 비타민 C 1% · 생강추출물, 계피분 기타 권장섭취량 및 섭취방법 · 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능
---



\* 보존 및 유통기준

본 제품의 효능 성분은 공기접촉, 온도, 물리적 충격에 안정한 천연화합물로서 물질 변화에 대한 위험은 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통 상 바람직함.

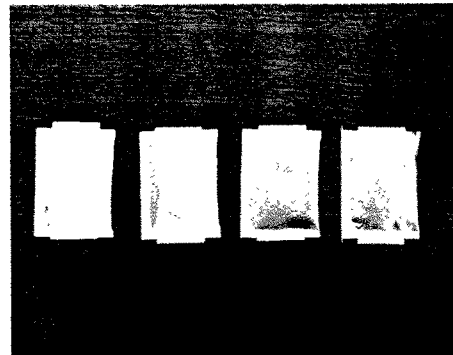
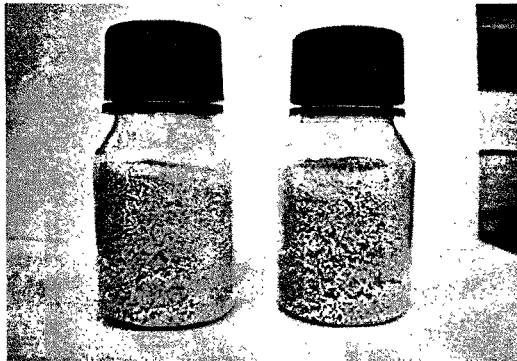
**다. 과립제 제작**

유자, 대추 두충, 석류의 추출분말 300 mg에 배합 예(Table 7-12)와 같이 부형제로 유당 700 mg, 옥수수 전분 3.5g, 산미제로 구연산 5mg을 혼합하여 제과하였으며 함습도를 시험후 정립 최종 혼합하였다.

**Table 3-6-3. 기능성 과립제제의 배합예**

<p>단위: 1포(5 g)                  제품유형: 건강보조식품(과립제제)</p> <p>성분:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 분말소재 300 mg</li> <li>· 옥수수 전분(부형제) : 3.5 g</li> <li>· 유당(부형제) : 0.65 g</li> <li>· 백당(감미제) : 0.5 g</li> <li>· 구연산(산미제) : 5 mg</li> </ul> <p>권장섭취량 및 섭취방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩</li> <li>· 식전 또는 식후에 섭취</li> <li>· 필요에 따라 증감 가능</li> </ul>
--

<p>단위: 1포(5g)                  제품유형: 건강보조식품(과립제제)</p> <p>성분:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 분말소재: 50 mg</li> <li>· 옥수수 전분(부형제) : 3.5 g</li> <li>· 유당 (부형제) : 0.65 g</li> <li>· 백당 (감미제) : 0.5 g</li> <li>· 구연산 (산미제) : 5 mg</li> </ul> <p>권장섭취량 및 섭취방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩</li> <li>· 식전 또는 식후에 섭취</li> <li>· 필요에 따라 증감 가능</li> </ul>
--



**\*보존 및 유통기준**

본 제품의 효능 성분은 공기접촉, 온도, 물리적 충격에 안정한 천연화합물로서 물질 변화에 대한 위험은 없으나 가능한 직사광선을 피하고 냉소에 보관하는 것이 제품의 장기간 유통상 바람직함.

**라. 제품의 외관 및 안정성 검사**

본 제품들은 일종의 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속하므로 외관검사는 6개월 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가혹실험(고온, 고압)을 실시하여 제품의 외관과 미생물 검사를 실시하였다.

**Table 3-6-4. 제품의 미생물검사**

-드링크제제의 저장조건: 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유자	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
대추	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
두충	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
석류	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출

- 연질 캡슐 제제의 저장 조건: 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유자	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
대추	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
두충	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
석류	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출

-과립 제품 저장 조건: 37℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유자	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
대추	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
두충	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
석류	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출

-드링크제제의 저장조건: 50℃, 1주일

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유자	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
대추	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
두충	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
석류	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출

-연질 캡슐제제 저장 조건: 50℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유자	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
대추	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
두충	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
석류	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출

-과립 제품 저장 조건: 50℃, 1개월

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
유자	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
대추	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
두충	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출
석류	1×10 <sup>2</sup> 이하	1×10 <sup>2</sup> 이하	불검출	불검출

Table 3-6-5. 제품의 외관검사

-드링크제제의 저장 조건: 37℃, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
유자	없음	없음	없음	없음
대추	없음	없음	없음	없음
두충	없음	없음	없음	없음
석류	없음	없음	없음	없음

-연질 캡슐제제의 저장조건: 37℃, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
유자	없음	없음	없음	없음
대추	없음	없음	없음	없음
두충	없음	없음	없음	없음
석류	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 37℃, 1개월

	침전물	이취	이미	변색
유자	없음	없음	없음	없음
대추	없음	없음	없음	없음
두충	없음	없음	없음	없음
석류	없음	없음	없음	없음

드링크제제의 저장 조건: 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
유자	없음	없음	없음	없음
대추	없음	없음	없음	없음
두충	없음	없음	없음	없음
석류	없음	없음	없음	없음

-연질 캡슐제제의 저장 조건: 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
유자	없음	없음	없음	없음
대추	없음	없음	없음	없음
두충	없음	없음	없음	없음
석류	없음	없음	없음	없음

-과립제제의 저장 조건: 50℃, 1주일

	침전물	이취	이미	변색
유자	없음	없음	없음	없음
대추	없음	없음	없음	없음
두충	없음	없음	없음	없음
석류	없음	없음	없음	없음

# 제 4장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제1절 연구 개발 목표의 달성도

### 1. 1차년도 연구 개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
<p>○제 1 세부과제 : 뇌기능 신경 전달 물질 분해효소 저해 미량소재의 실용화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 분해효소 저해활성 검색</li> <li>- 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 세포내 수용성물질의 저해활성 검색</li> <li>- 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 저해활성 검색</li> <li>- 신경전달물질 분해효소 저해제의 <i>in vivo</i> 활성 및 일부 독성실험</li> <li>- 분해효소 저해활성 물질의 예비 정제조건 검토</li> </ul>	100
<p>○제 2 세부과제 : 뇌기능 신경전달물질 합성효소 활성화 미량소재의 실용화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 합성효소 활성화 성분 검색</li> <li>- 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 세포내 수용성물질의 활성화 성분 검색</li> <li>- 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 활성화 성분 검색</li> <li>- 신경전달물질 합성효소 활성화제의 <i>in vivo</i> 활성 및 일부 독성실험</li> <li>- 합성효소 활성화 성분의 예비 정제조건 검토</li> </ul>	
<p>○제 3 세부과제 : 외인성 피부노화 제어 미량소재의 실용화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 피부노화 항노화 성분 검색</li> <li>- 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 세포내 수용성물질의 항노화 성분 검색</li> <li>- 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 항노화 성분 검색</li> <li>- 피부노화에 대한 표피세포 <i>in vivo</i> 활성 및 일부 독성실험</li> <li>- 피부노화 항노화 성분의 예비 정제조건 검토</li> </ul>	

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
○ 제 4 세부과제 (협동과제) : 비만·당뇨 예방용 glucose uptake 조절 미량소재의 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 포도당 조절성분 검</li> <li>- 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 세포내 수용성물질의 조절성분 검색</li> <li>- 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 조절성분 검색</li> <li>- 장내 포도당 uptake 조절의 <i>in vivo</i> 활성 및 일부 독성실험</li> <li>- Glucose uptake 조절물질의 예비 정제조건 검토</li> </ul>	100

## 2. 2차년도 연구개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
○ 제 1 세부과제 : 뇌기능 신경 전달물질 분해효소 저해 미량 소재의 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i>에서의 신경전달물질 분해 효소 저해 물질의 독성 실험 및 인지능력 실험</li> <li>- 선정 식·약용 생물자원으로부터 분해 효소의 저해 성분 추출, 정제 및 특성 검토</li> <li>- 선정된 식·약용 생물자원으로부터 분해효소의 저해 성분 공업적 추출 조건 확립</li> <li>- 공업적 순도 수준의 분리 정제법, 소재화 확립</li> </ul>	100
○ 제 2 세부과제 : 뇌기능 신경 전달물질 합성효소 활성화 미량소재의 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i> 에서의 신경전달물질 합성효소 활성화 물질의 독성 실험 및 인지능력 실험</li> <li>- 선정 식·약용 생물자원으로부터 합성 효소 활성화 물질의 추출, 정제 및 특성화</li> <li>- 선정된 식·약용 생물자원으로부터 합성 효소 활성화 물질의 공업적 추출 조건 확립</li> <li>- 공업적 순도 수준의 분리 정제법, 소재화 확립</li> </ul>	
○ 제 3 세부과제 : 외인성 피부노화 제어 미량소재의 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i>에서의 피부노화에 대한 표피세포 보호 활성 물질의 독성 실험</li> <li>- 선정된 식·약용 생물자원으로부터 피부노화 제어 물질의 추출, 정제 및 특성 검토</li> <li>- 선정 식·약용 생물자원으로부터 피부노화 제어 물질이 공업적 추출조건 확립</li> <li>- 공업적 순도 수준의 분리 정제법, 소재화 확립</li> </ul>	
○ 제 4 세부과제 (협동과제) : 비만·당뇨 예방용 glucose uptake조절 미량 소재의 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vivo</i>에서의 장내 포도당 uptake 조절 활성 물질의 독성실험</li> <li>- 선정된 식·약용 생물자원으로부터 glucose uptake 조절 물질의 추출, 정제 및 특성 검토</li> <li>- 파쇄한 각종 식·약용 생물자원의 용매별 추출물로부터 glucose uptake 조절 물질의 공업적 추출 조건 확립 조절성분 검토</li> </ul>	



### 3. 3차년도 연구개발 목표 달성도

세부과제명	연구개발 목표 및 내용	달성도 (%)
○ 제 1 세부과제 : 뇌기능 신경 전달 물질 분해효소 저해 미량소재의 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 선정된 유자 (<i>Citrus junos</i>)로부터 AChE inhibitor 성분의 공업적 추출 조건 확립\</li> <li>- 공업적 순도 수준의 분리 정제법, 소재화 확립</li> <li>- 정제된 유자 (<i>Citrus junos</i>)의 구조 분석 (NMR/Mass를 이용)</li> <li>- 선정된 유자의 품질 적성을 확인하고 실용화를 위한 가공 조건 확립 (소재 적성에 맞는 가공 및 포장 방법)</li> </ul>	
○ 제 2 세부과제 : 뇌기능 신경전달물질 합성효소 활성화 미량소재의 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 선정된 ChAT 활성화 물질인 대추 (<i>Zyzypos jujuba</i>)의 공업적 추출을 위한 최적 조건 확립</li> <li>- 공업적 순도 수준의 분리 정제법, 소재화 방법의 적립</li> <li>- 정제된 대추 (<i>Zyzypos jujuba</i>)로부터의 ChAT 활성화 물질의 구조해석</li> <li>- 대추 (<i>Zyzypos jujuba</i>) 추출물의 공업적 실용화를 위한 품질적성 확인 및 가공 조건 확립</li> </ul>	
○ 제 3 세부과제 : 외인성 피부노화 제어 미량소재의 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식·약용 생물자원으로부터 선정된 두충 추출물로부터 피부 노화 제어물질의 공업적 추출 조건 확립</li> <li>- Open column 및 HPLC 등을 이용한 공업적 순도 수준의 분리 정제 및 소재화 방법의 확립</li> <li>- <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR, MS, IR 등을 이용하여 두충에서 정제된 피부노화 제어물질의 구조 해석</li> <li>- 실용화를 위한 두충 추출물의 품질 적성 및 가공 조건 검토</li> </ul>	100
○ 제 4 세부과제 (협동과제) : 비만·당뇨 예방용 glucose uptake조절 미량 소재의 실용화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 선정된 식류 추출물로부터 glucose uptake 조절 물질의 공업적 추출 조건 확립</li> <li>- 각종 column working을 통한 공업적 순도 수준의 분리 정제법 및 소재화 확립</li> <li>- 식류로부터 정제된 glucose uptake 조절 물질의 구조해석과 수식 확인</li> <li>- 식류 정제물의 공업적 실용화를 위한 품질 및 가공 적성 확인</li> </ul>	

#### 4. 평가 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	달성도 (%)
1차년도(2000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 검색시 활성측정법의 적합성</li> <li>○ 검색방법의 효율성 및 창의성</li> <li>○ 고 생리활성 식·약용류의 선정결과</li> </ul>	20 30 50	100
2차년도(2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 추출 조건 및 방법의 확립여부</li> <li>○ 생리활성 물질의 정제결과와 정제 물질 순도 검정법의 명확성</li> <li>○ 공업적 순도수준의 대량정제법 및 확립 여부</li> </ul>	30 40 30	100
3차년도(2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 물질의 구조규명 결과</li> <li>○ 소재화의 적성 검토</li> <li>○ 시작품의 제조</li> </ul>	50 30 20	100
최 종 평 가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약리·생리활성 물질의 구조해석 여부</li> <li>○ 물질의 소재화 여부</li> </ul>	30 70	100

## 제 2절. 관련분야에의 기여도

### 1. 기술적 측면

- 종래의 방법과 달리 재료를 파쇄한 후 활성을 측정함으로써 세포내의 성분을 동시에 검색할 수 있는 기법의 도입
- 하나의 추출조건이 아닌 다양한 추출조건 별로 활성을 검색하는 기법의 도입
- 추출 폐기박의 감량화를 이룰 수 있는 추출방법의 확립
- 고형물 중량당 추출율을 향상시킬 수 있는 추출방법의 확립
- 생리활성 물질의 신속간편 정제법의 도입
- 생리활성 미량성분의 막농축 기술 확립
- 공업적 순도 수준의 대량 정제법 확립
- 생리활성 미량소재의 기능성 식품화 기술의 도입
- 생리활성 미량성분의 기능성 화장품화 기술의 도입
- 국내 고유의 식용·약용식물로부터 약리성·생리활성 신규후보 물질의 개발 모델 제시
- *In vitro, in vivo* 활성측정계의 도입

### 2. 경제·산업적 측면

- 1차 산물의 고부가 가치화로 시장 경쟁성 확보
- 1차 산물의 생산의욕 고취로 농가의 소득증대에 기여
- 1차 산물의 미이용부 및 폐기처리부를 자원화함으로써 폐기물의 감량화와 농촌환경의 개선 기대
- 기술의존도가 높은 무공해 산업종으로 향후 국내산업 개편의 모델이 됨
- 외국의 기존 물질특허와 마찰을 일으키지 않는 신규물질이 창출될 가능성이 높고 신규물질에 따라서는 거대 수출품목이 될 수 있음
- 현재 수입되고 있는 유사소재의 수입대체 효과
- 제약, 식품 및 화장품 산업의 영역을 넓힘으로써 이들 산업의 경쟁력 제고에 기여
- 농업과 제조업 연계로 지역경제의 활성화에 기여

## 제 5장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절 추가 연구의 필요성

본 연구를 수행하여 식·약용 생물자원을 이용하여 대표적인 고령화 질환의 예방 또는 치료에 적용될 수 있는 미량 성분을 소재화 하고 이들 소재를 주제로 한 제품을 실용화하기 위한 기초를 마련하였다. 각각의 소재가 각각의 질환에 효과가 있음을 밝혔으나 어떠한 기전으로 작용하는지에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 판단되어지며, 각각의 소재를 응용하여 다른 질환에도 적용가능한지에 대해서도 연구할 필요성이 있는 것으로 사료된다.

### 제 2절 타 연구에의 응용

식·약용 생물자원에서 얻은 미량소재를 이용한 예방과 치료는 비단 본 연구에서 적용한 질환에 국한되지 않고 타 질환에도 이용이 가능할 것으로 여겨진다. 또한 미량소재를 개발하기 위해 사용한 순수 물질 분리방법은 의약품 및 기능성 식품 소재의 개발에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료 된다.

### 제 3절 기업화 추진 방안

본 연구를 바탕으로 한 기능성 식품 및 의약품 소재로서의 개발은 특별한 시설이 필요하지 않고 개발이 가능할 것으로 생각되어지며 그렇기 때문에 여러 분야에 응용이 가능할 것으로 생각된다.

- 1) 기능성 차의 개발로 기호 식품화 할 수 있으며 건강관리가 필요한 중·장년층을 대상으로 할 수 있다.
- 2) 식·용 생물자원에서 추출한 조추출물을 이용하여 드링크 음료화하여 기능성 음료로의 개발이 가능하다.
- 3) 연질 캡슐 및 과립화를 이용하여 섭취방법을 쉽게 함으로써 기존의 동물성 원료를 이용한 기능성 식품을 선호하지 않거나 또는 섭취할 수 없는 사람들을 대상으로 하여 기능성 식품으로써 개발이 가능하다.
- 4) 천연생물자원으로부터 기능성 미량소재를 얻는 방법이 체계화 되고 쉬워짐으로써 더 나아가 미량소재와 병의 메카니즘을 연구하여 이를 통한 의약품 소재로서의 개발도 가능하다.

## 제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보

### 1. Y-maze test

A, B, C의 3개의 arm이 Y자로 결합되어진 Y-maze를 이용하며 한 지점을 출발점으로 하여 mice를 arm에 넣은 다음 mouse가 들어간 arm을 기록하여 점수화 하여 인지력을 측정하는 방법이다.

- *European Neuroscience Association*. 1999:11: 83-90.
- *British Journal of Pharmacology*. 2001:133: 89-96.

### 2. Passive avoidance test

Mice를 훈련과정을 거친 후 암실로 mouse가 들어간 시간을 체크하고 점수화 하여 인지력 측정한다. 암실로 들어가는 시간이 길수록 학습이 잘 되었다고 본다.

훈련:

- ① 명(明)실에서 빛 전기 쇼크(0.5 mA, 1sec) 없는 상태에서 1분간 적응
- ② 명(明)실에서 전기 쇼크 없고 빛있는 상태에서 2분간 적응
- ③ 명(明)실에서 암실로 mouse 들어가면 전기 쇼크를 줌

실험: mouse가 명실에서 암실로 들어갈 때의 시간을 측정하여 점수화 함

- *European Neuroscience Association*. 1999:11: 83-90.
- *British Journal of Pharmacology*. 2001:133: 89-96.
- *Neurochemical Research*. 2002:27: 277-281.
- *European Neuroscience Association*. 2001:421: 265-272.

### 3. Choline acetyltransferase activator assay

MC-IXC cell에서 얻은 crude enzyme과 [<sup>14</sup>C] acetyl CoA를 이용하여 choline acetyltransferase의 활성을 측정한다.

- *Biochemical Journal*. 2000;349: 141-151.
- *Journal of Neurochemistry*. 1985:45: 611-620.
- *Brain research*. 1996:80: 99-109.

### 4. Acetylcholinesterase inhibitor assay

PC-12 cell에서 얻은 crude enzyme과 acetylthiocholine을 이용하여 acetylcholinesterase의 저해 활성을 측정한다.

- *Biochemical Pharmacology*. 1961:7: 88-95.
- *Journal of Immunological Methods*. 1983:65: 55-63.

## 5. UVB에 의한 MMP-1생성의 측정

HS68 human foreskin fibroblast cell line에 UVB를 조사하여 상등액을 취하여 ELISA법을 이용하여 MMP-1의 생성을 측정한다.

- *Journal of Biological Chemistry.*, 273: 32176-32181 (1998)

## 6. Glucose uptake 저해 활성 측정

Caco-2cell과 2-NBDG를 이용하여 glucose transport를 cell 배지상에서 측정하였으며 BBMV(Brush-border membrane vesicles)를 이용하여 glucose uptake를 배지를 제거한 cell의 형광세기를 spectrophotofluorometer를 이용하여 측정한다.

### \* Glucose uptake system

- *American Journal of Physiology.*, 262: C795-800 (1992)

- *Journal of Nutrition.*, 124: 580-587 (1994)

### \* Transport assay system

- *Journal of Pharmacological Science.*, 90: 1593-1598 (2001)

- *Biopharmaceutics & Drug Disposition.*, 22: 23-29 (2001)

- *Pharmacological Research.*, 18: 1420-1425 (2001)

### \* BBMV

- *In vivo.* 15: 81-86 (2001)

### \* ELISA assay system

- *British Journal of Dermatology.*, 144: 229-237 (2001)

- *Biological Chemistry.*, 381: 509-516 (2000)

## 제 7장 참고 문헌

Axelrod, J. D., Pilch, P. F. Unique cytochalasin B binding characteristics of the hepatic glucose carrier. *Biochemistry.*, **22**: 2222-2227 (1983).

Benishin, C. G., Carroll, P. T. Acetylation of choline and homocholine by membrane bound choline-O-acetyltransferase endings. *J. Neurochem.*, **36**: 732-740 (1981).

Bird, T. D., Stranhan, S., Sumi, S. M., Raskind, M. Alzheimer's disease: choline acetyltransferase activity in brain tissue from clinical and pathological subgroups. *Ann. Neurol.*, **14**: 284-293 (1983).

Broadwell, R. D., Sofroniew, M. V. Serum Proteins Bypass the Blood-Brain Fluid Barriers for Extracellular Entry to the Central Nervous System. *Exp. Neurol.*, **120**: 245-263 (1993).

Carr, D. B., Goate, A., Morris, J. C. Current concepts in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am. J. Med.*, **103**: 3S-10S (1997).

Chung, Y. K., Heo, H. J., Kim, E. K., Kim, H. K., Heo, T. L., Lim, Y. H., Kim, S. K. and Shin, D. H. Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Organum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Mol. Cells.*, **11**(2): 137-143 (2001).

Claude S., Manabu K., Laura M. and Lester P., Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation induced NF-Kappa-B activation on a human keratinocyte cell line. *Free radical Biol. & Med.*, **26**: 174-183 (1999).

Collerton, D. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience.*, **19**: 1-28 (1986).

Ellwood, K. C., Chatzidakis, C. and Failla, M. L. Fructose utilization by the human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **202**: 440-446 (1993).

Flood, J. F., Morley, J. E., Roberts, E. Amnestic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid  $\beta$  protein from patients with Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**: 3363-3366 (1991).

Fonnum, F. A rapid radiometric method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* **24**: 407-409 (1975)

Gasparin, L., Rasshi, M., Binetti, G., Trabucchi, M., Solerte, S. B., Alkon, D., Etcheberrigary, R., Gibson, G., Blass, J., Paoletti, R., Govoin, S. Peripheral markers in testing pathophysiological hypothesis and diagnosing Alzheimer's Disease. *FASEB J.*, **12**: 17-34 (1998).

Glenner, G. G., Wong, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**: 10739-10741 (1984).

Gray J. Fisher, Subhash C., Datta, Harvinder S., Tawar and John J., Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature.*, **375**: 335-339 (1996).

Heo, H. J., Hong, S. C., Kim, H. K., Kim, E. K., Cho, H. Y., Hong, B. S. and Shin, D. H. Inhibitory effect of zeatin, isolated from *Fiatoua villosa*, on acetylcholinesterase activity from PC12 Cells. *Mol. Cells.*, **13**(1): 113-117 (2002).

Heo, H. J., Yang, H. C., Cho, H. Y., Hong, B. S., Lim, S. T., Park, H. J., Kim, K. H., Kim, H. K. and Shin, D. H. Inhibitory effect of *Artemisia asiatica*



alkaloids on acetylcholinesterase activity from rat PC12 cells. *Mol Cells*, **10**(3): 253-262 (2000).

Kang S., Fisher J. and John J., Photoaging and topical tretinoin. *Arch Dermatol*, **133**: 1280-1284 (1997).

Mario, B., Luigi, F., Sperandian, L. and Maggi, A. New acetylcholinesterase inhibitors. *Drug Fut.*, **22**(4): 397-411 (1997).

Oku, A., Ueta, K., Arakawa, K., Ishihara, T., Nawano, M., Kuronuma, Y., Matsumoto, M., Saito, A., Tsujihara, K., Anai, M., Asano, T., Kanai, Y. and Endou, H. T-1095, an inhibitor of renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes. *Diabete.*, **48**: 1794-1800 (1999).

Oda, Y. Choline acetyltransferase the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol. Int.*, **49**: 921-937 (1999).

Park, C. H., Kim, S. H., Choi, W., Lee, Y. J., Kim, J. S., Kang, S. S., Suh, Y. H. Novel acetylcholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.*, **62**: 405-409 (1996).

Resendiz-Huitron, S., Gombart, L., Cravatt, B. F., Henriksen, S. J. Effect of oleamide on sleep and its relationship to blood pressure, body temperature and locomotor activity in rats. *Exp. Neurol.*, **172**: 235-243 (2001).

Rieger, F., Shelanski, M. L., Greene, L. A. The effects of nerve growth factor on acetylcholinesterase and its multiple forms in cultures of rat PC12 pheochromocytoma cells: Increased total specific activity and appearance of the 16S molecular form. *Dev. Biol.*, **76**: 238-243 (1980).

Stefan B. and Richard D. Granstein, UV-induced cutaneous photobiology. *Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.*, **31**: 381-404 (1995).

Tsujihara, K., Hongu, M., Saito, K., Kawanishi, H., Kuriyama, K., Matsumoto, M., Oku, A., Ueta, K., Tsuda, M. and Saito, A. Na(+)-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors as antidiabetic agents. 4. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives substituted on the B ring. *J. Med. Chem.*, **42**: 5311-5324 (1999).

Vedavanam, K., Sriyanta, S., O'Reilly, J., Raman, A. and Wiseman, H. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soybean phytochemical extract (SPE). *Phytother Res.*, **13**: 601-608 (1999).

Wright, E. M. The intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.*, **55**: 575-589 (1993).

Yoshioka, K., Saito, M., Oh, K.B., Nemoto, Y., Matsuoka, H., Natsume, M. and Abe, H. Intracellular fate of 2-NBDG, a fluorescent probe for glucose uptake activity, in *Escherichia coli* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**: 1899-1901 (1996).

Yamada, K., Nakata, M., Horimoto, N., Saito, M., Matsuoka, H. and Inagaki, N. Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.*, **275**: 22278-22283 (2000).

최옥자, 약초의 성분과 이용. 일월서각, 1999.

부록

학회 발표 및 논문 발표

2001년도 한국노화학회 춘계 학술대회

## **Aging-associated functional changes & Reactive oxygen species**



일 시 : 2001년 5월 12일 토요일 10:00-18:00

장 소 : 한국과학기술원(KAIST) 의과학연구소 강당

주 최 : 한국노화학회

Activation Effect of *Zizyphus jujuba* Extract on Choline Acetyltransferase  
from MC-IXC Cell

Young-June Park<sup>1</sup>, Ho-Jin Heo<sup>1</sup>, Young-Min Suh<sup>1</sup>, Hong-Yon Cho<sup>1</sup>, Bum-Shik Hong<sup>1</sup>,  
Hye-Kyung Kim<sup>2</sup>, Dong-Hoon Shin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate school of Biotechnology, Korea University, Seoul

<sup>2</sup>Department of Food and Biotechnology, Hansoo University, Seosan

We screened 60 Korean traditional tea plants and 30 phaste plants to determine the activation effect of Choline Acetyltransferase (ChAT), which was related to the treatment of Alzheimers Disease (AD). The methanol extracts from *Zizyphus jujuba* among tested 60 samples, showed the most stable activation effect on ChAT *in vitro*. The methanolic extract was separated *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate in order. The chloroform fractions were high in activation effect of ChAT, were repeatedly subjected to open column chromatography on silica gel. From the highest activation effect fraction on ChAT, the single compound was obtained by the WHATMAN 0.2  $\mu$ m syringe filter. This compound was purified by HPLC ( $\mu$ -bondapak C<sub>18</sub> reverse phase column: 7.8 $\times$ 300 mm) and identified by <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), Electron Impact mass spectroscopy (EI-MS).

Acknowledgments: This study was supported by the BK21 Program, Ministry of Education, ROK.

## Inhibitory effect of *Citrus junos* methanolic extracts on Acetylcholinesterase

Jeong-Min Lee<sup>1</sup>, Ho-Jin Heo<sup>1</sup>, Hong-Yon Cho<sup>1</sup>, Bumshik Hong<sup>1</sup>, Hye-Kyung Kim<sup>2</sup>,  
Dong-Hoon Shin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate school of Biotechnology, Korea University, Seoul,

<sup>2</sup>Department of Food and Biotechnology, Haseo University, Seosan

This study were performed to identify safer and more effective acetylcholinesterase inhibitors for treating Alzheimer's disease (AD) than that presently exist. We extracted *Citrus junos* with methanol. The methanolic extracts from *Citrus junos* presented the highest inhibitory effect (43%) on acetylcholinesterase *in vitro*. The acetylcholinesterase assay was performed basically using the colorimetric method using 96-well microplate reader. The methanolic extract was more seperated with hexane, chloroform, and ethylacetate of water, in order. The ethylacetate solubles were high inhibitory effect of acetylcholinesterase (55%). Those were subjected to open silica gel column chromatography on twice times. In the process of isolation, each subfraction was presented acetylcholinesterase inhibitory activity. From the first silica gel column chromatography, each subfraction was high inhibitory effect (53, 57%) against acetylcholinesterase which chloroform to methanol ratios were (80 : 20), (70 : 30). On the second silica gel column chromatography further seperated with chloroform and methanol, it showed (48%) inhibitory activity against acetylcholinesterase which chloroform to methanol ratio was (80 : 20). This compound was purified by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). To more purified compound, we are sampling.

**Acknowledgments** This study was supported by the BK21 Program, Ministry of Education, ROK.

---

---

2001년도 한국식품과학회

## 정기총회 및 제67차 학술발표회

- ❖ 식품산업의 신제품개발 전략 및 우수제품 소개 심포지엄 (10월 19일)
- ❖ 식품소재의 생리기능성 평가방법 워크샵 (10월 20일)

2001년 10월 18일 (목) ~ 20일 (토)

제주대학교 자연과학대학



후원 : 한국과학기술단체총연합회

---

---

## Acetylcholinesterase에서 *Citrus junos* Methanol 추출물의 억제효과

이정민\*, 허호진, 조홍연, 홍범식, 김혜경<sup>1</sup> 신동훈  
고려대학교 생명공학원, <sup>1</sup>한서대학교 식품생명공학과

이 연구는 Alzheimer's disease(AD) 치료에 있어서 안전하고 더욱 효과적인 acetylcholinesterase 저해제를 탐색하는데 그 목적이 있다. 약 40여 종의 전통차류를 검색한 결과 비교적 저해활성이 높은 *Citrus junos*(유자)를 선정하여 methanol로 추출하였다. Acetylcholinesterase 저해 활성 측정은 96-well microplate reader를 사용하였으며 *Citrus junos* 추출물은 *in vitro* 상에서 43%의 저해 효과를 나타내었다. Methanol 추출물을 극성에 따라 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate 순으로 분획하였고 ethylacetate 획분이 55%로 가장 높은 저해 효과를 보였다. 다음으로 1, 2차 silica gel open column chromatography를 시행하였다 첫 번째 silica gel open column chromatography에서 chloroform과 methanol의 비율이 (80:20), (70:30)의 분획에서 각각 53, 57%의 저해효과를 보였으며 이를 두 번째 silica gel column chromatography를 통해 분획한 결과 chloroform과 methanol의 비율이 (86:14)에서 58%의 저해효과를 보였다. 분획된 물질을 preparative thin layer chromatography(pre-TLC)를 통해서 R<sub>f</sub> value 0.56인 band가 저해활성 효과 59%를 나타내었고, 이에 분획된 물질을 가지고 특성 실험을 행하였다.



*Experimental*

# NEUROBIOLOGY

Proceedings for the 3<sup>rd</sup> FAONS Congress

VOLUME 11  
NUMBER 2  
SUPPLEMENT  
SEPTEMBER  
2002

The Korean Society for Brain and Neural Sciences  
The Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies

## P-781

### Enhancement of Choline Acetyltransferase Activity and Learning and Memory Deficit by Zizyphus Jujuba Methanol Extracts

H.J. Heo, S.J. Choi, Y.M. Suh, J.M. Lee, M.J. Kim, H.Y. Cho, B.S. Hong, H.K. Kim<sup>1</sup>, D.H. Shin

Graduate School of Biotechnology, Korea Univ., Seoul, Korea; <sup>1</sup>Dept of Food and Biotechnology, Hanseo Univ., Seosan, Korea

We screened 60 Korean traditional tea plants and 30 paste plants to determine the activation effect of choline acetyltransferase (ChAT), which was related to the treatment of Alzheimer's disease. The methanol extracts from Zizyphus jujuba among tested 90 samples, showed the most stable activation effect on ChAT in vitro (62.1%). In acute toxicity study on Zizyphus jujuba methanol extracts, all mice survived to the end of the study. There were no mortalities in mice in controls or at any treatment level. Also there were no statistically significant differences in mean level of mice glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT). Scopolamine is a muscarinic cholinergic receptor blocker. In this study, we examined whether Zizyphus jujuba methanol extracts ameliorate learning and memory deficits caused by intraperitoneally injection of scopolamine. Injection of control mice with scopolamine impaired performance on the passive avoidance test (31% decrease in step-through latency), Y-maze test (16% decrease in alteration behavior). In contrast, mice treated with Zizyphus jujuba methanol extracts prior to scopolamine administration were protected from these changes (12-25% decreases in step-through latency; 1-10% decreases in alteration behavior). These results demonstrate that oral administration of Zizyphus jujuba methanol extracts induce resistance to scopolamine toxicity in the brain, and suggest that Zizyphus jujuba methanol extracts may be a useful chemopreventive material against Alzheimer's disease.

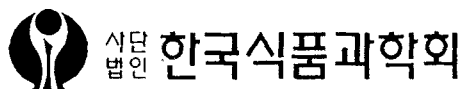
Key Words: Alzheimer's disease, Zizyphus jujuba, Cholineacetyltransferase, Behavioral test, Learning and memory

2002년도 한국식품과학회

## 정기총회 및 제69차 학술발표회

2002년 10월 24일(목) ~ 26일(토)

무주리조트 티롤 호텔



후원 : 한국과학기술단체총연합회, 한국학술진흥재단  
(주)농심, (주)대두식품, (주)대상식품, 순창 문옥레식품

**Inhibitory Effect of *Citrus Junos* Methanolic Extracts on  
Acetylcholinesterase and Prevention on Learning and Memory Deficits  
in Mice.**

Jeong-Min Lee\*, Ho-Jin Heo, Mi-Jeong Kim, Yung-Min Seo, Su-Jung Choi,  
Hong-Yon Choi, BumShik Hong, Hey-Kyung Kim<sup>1</sup>, Dong-Hoon Shin  
Graduate school of Biotechnology, Korea University, 136-701 Seoul,  
<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, 356-820 Seosan

In this study, we performed safer and more effective acetylcholinesterase inhibitors for treating Alzheimer's disease(AD) than those of presently exist. The methanolic extracts from *Citrus junos* presented the highest inhibitory effects on acetylcholinesterase in vitro. We investigated the effect of *Citrus junos* the scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in the Y-maze, an index of short-term memory and passive avoidance task in mice. Scopolamine injected mice were lowered learning and memory ability. In contrast, scopolamine-injected mice treated with *Citrus junos* methanol extract were protected from these changes. These results suggest that treatment with the methanolic extract of *Citrus junos* may prevent learning and memory deficits caused by scopolamine

# ***International Symposium on Food, Nutrition and Health for 21st Century***

*30th Anniversary of the Korean Society of Food Science and Nutrition*

Proceedings and Abstracts

December 7-8, 2001

Graduate School of Biotechnology Building, Korea University, Seoul, Korea

Sponsors : Ministry of Health and Welfare  
Korea Research Foundation  
The Korean Federation of Science and Technology Societies



**CHEILJEDANG** Corporation

**K-F-N** The Korean Society of Food Science and Nutrition

## Sodium-dependent D-Glucose Uptake in Brush Border Membrane Vesicles Isolated from Mice Intestine

Soon-Sun Back<sup>\*</sup>, Ji-Sun Kim, Hye-Kyung Kim<sup>1</sup>, Dong Hoon Shin, Bum-Shik Hong and Hong-Yon Cho

Graduate School of Biotechnology, Korea University

<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Dietary sugars, glucose and galactose, are absorbed from the lumen of the intestine across the brush border membrane into the enterocytes mainly by the sodium-dependent glucose transporter, SGLT1. SGLT1 has been known to be the most abundant glucose transporter in the small intestine. Inhibition of intestinal glucose uptake is important in reducing the blood glucose level for diabetic patient. Inhibition of glucose uptake were performed with mice intestinal brush border membrane vesicles (BBMV's) using a novel fluorescent derivative of glucose, 2-NBDG. BBMV's comprise spherical membrane vesicles on which SGLT1 is expressed, the outer surface representing the intestinal lumen and the core of the vesicle representing the intestinal cell. The advantage of using BBMV's is that SGLT1-mediated glucose transport can be studied without any interference from the cytoplasmic glucose metabolism. In this study glucose uptake by mice BBMV's was mostly sodium-dependent pathway (80%) with minimal sodium-independent pathway (20%). Glucose uptake was increased linearly with incubation time upto 30 min and started to decrease thereafter.

P11-54

### 소장 glucose uptake/transport 저해활성 물질의 *in vitro* 및 *in vivo* 검색

백순선<sup>\*</sup>, 김혜경<sup>1</sup>, 신동훈, 홍범식, 조홍연  
고려대학교 생명공학전, <sup>1</sup>원서대학교 식품생물공학과

당뇨 및 비만과 관련된 체내 glucose uptake/transport에 관한 연구는 췌장, 간, 신장, 근육 및 지방 조직 등에서 다양하게 이루어져 왔으나, 외부로부터 실질적인 glucose 흡수를 담당하는 소장에서의 연구는 미미한 실정이다. 본 연구의 목적은 장관에서의 glucose 흡수 저해 및 조절 phytochemicals를 검색하여 당뇨 환자의 고혈당을 완화시키고, 비만의 개선 및 예방적 기능을 갖는 식물성 소재화시키는 것이다. Human intestinal epithelial cell line인 Caco-2 cell과 fluorescent glucose analog인 2-NBDG를 이용하여 새로운 uptake/transport assay계를 확립하였다. 극성도에 따라 추출한 200여종의 식·약용 생물자원을 대상으로 glucose uptake 저해활성을 1차 검색한 결과, 식유(MeOH Fr: 35%), 래니쉬(MeOH Fr: 29%), 감잎(Hot water Fr: 23%), 무중잎(Cold water Fr: 25%) 등의 추출물에서 각각 높은 저해활성을 나타내었다. 선정된 4종의 추출물을 대상으로 transwell을 이용한 glucose transport assay와 마우스의 소장 점막세포로부터 분리해 낸 brush border membrane vesicle을 이용한 glucose uptake assay를 각각 실시한 결과, 1차 검색 결과와 일치하는 경향을 보였다. *In vivo* 실험에서는 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 마우스를 사용하여 혈당 조절 및 소장에서의 glucose uptake 저해 활성을 검토하였다.

2002년도 한국식품과학회

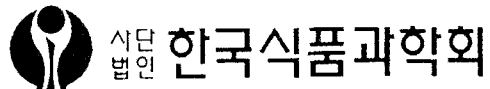
## 임시총회 및 제68차 학술발표회

〈클로렐라의 기능성 심포지엄〉

〈Chromium picolinate의 기능성 심포지엄〉

2002년 5월 25일 (토)

서울산업대학교 응용화학공학관



## Isolation and Characterization of Intestinal Glucose Uptake Inhibitor from *Punica granatum*

Soon-Sun Baek\*, Hye-Kyung Kim<sup>1</sup>, Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong, Hong-Yon Cho  
Graduate School of Biotechnology, Korea University  
<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Dietary carbohydrates are hydrolysed and absorbed in small intestine. Intestinal glucose uptake is mainly performed by the sodium-dependent glucose transporter, SGLT1. Inhibition of intestinal glucose uptake is beneficial in reducing the blood glucose level for diabetes and controlling weight gain for obesity. By using human intestinal epithelial Caco-2 cell, mice intestinal BBMV and novel fluorescent glucose analog (2-NBDG), we screened the inhibitory activities of intestinal glucose uptake in six hundred extracts prepared by solvent extraction based on polarity from the two hundred kinds of edible plants, fruits and vegetables. The effects of food substances on SGLT1 expression were evaluated by ELISA and Western blot analysis. We found an appreciable high inhibitory effect in methanol extract from *Punica granatum*. The present results suggest that *Punica granatum* could play a role in controlling the dietary glucose absorption by down-regulation of intestinal transporters and possibly contribute to decreasing blood glucose level.

P8-56

### 두충(*Eucommia ulmoides*)으로부터 광노화 억제활성물질의 분리

호진녕\*, 김혜경<sup>1</sup>, 신동훈, 홍범식, 조홍연  
고려대학교 생명공학원, <sup>1</sup>한서대학교 식품생물공학과

피부노화는 연령에 따른 연대기 노화(chronological aging)와 장기간 자외선 노출에 의한 광노화(photoaging)로 구분된다. 특히 자외선은 피부내 진피세포와 표피세포의 MMP(Matrix Metalloproteinase) 분비를 증가시킴으로써 MMP와 TIMP(Tissue Inhibitors of Metalloproteinase)의 균형을 깨뜨려 진피층이 붕괴되고 결국 피부 노화를 일으키게 된다. 광노화는 굵고 깊은 주름, 피부 면역기능 저하, 불균일한 색소침착 등을 나타내며, 피부암을 유발할 수 있다. 본 연구는 식용생물자원 함유 피부 광노화 억제활성물질을 분리하기 위해 검색용 *in vitro* assay계로 human foreskin fibroblast HS-68 cell line을 사용한 ELISA assay계를 확립한 후 UVB 조사에 의해 분비되는 핵심 MMP인 MMP-1을 정량하였다. 400여종의 식용생물자원으로부터 추출한 1,200여점의 extracts library를 대상으로 MMP-1 저해활성을 검색한 결과 높은 억제 활성을 보인 두충 메탄올 추출물을 최종 시료로 선정하였다. 이 추출물로부터 silica gel 60 open column chromatography, Prep. TLC, HPLC 순으로 광노화 억제활성물질을 분리, 일부 물리화학적 성질을 검토하였다.



2002년도 한국식품영양과학회  
제 52차 학술발표회 및 정기총회

# 전통식품의 가공기술과 영양

- 일 시 : 2002년 11월 9일 (토) 09:00~17:30
- 장 소 : 원광대학교 송산기념관 (전북 익산)
- 주 최 : 주최 한국식품영양과학회
- 후 원 : 한국학술진흥재단, 한국과학기술단체총연합회
- 협 찬 : 미국대두협회, (주)건보, 순창문옥례식품, 일양약품(주),  
진성식품, (주)대두식품, (주)코메드, (유)한풍제약, 꼬끼리식품,  
(주)유니콘, (주)하림, 보해양조(주)

**KFSN** 사단  
법인 **한국식품영양과학회**  
KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION

## Inhibitory Effect of Seaweeds on Small Intestine Glucose Uptake/Transport *in vitro* & *in vivo* Assay System

Ji-Sun Kim<sup>1</sup>, Hye-Kyung Kim<sup>1</sup>, Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong and Hong-Yon Cho  
Graduated School of Biotechnology, Korea University,  
<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Hansoo University

Recently, the obesity population were rapidly increased according to westernization of lifestyle, and increased adult disease, diabetes mellitus(DM) and hypertensive arteriopathy. Inhibition of intestinal glucose uptake may be beneficial to reduce the blood glucose level after meals for diabetic and control weight gain for obesity. In this study by using human intestinal epithelial Caco-2 cell and fluorescent glucose analog(2-NBDG), we established the *in vitro* assay system and measured glucose uptake/transport inhibitory effect. Screening of intestinal glucose uptake and transport inhibitor from edible seaweed were extracted by polarity solvent. We showed about 20% inhibitory effect in methanol extract of *Laminaria japonica* from Ju-Mun-Jin, *Enteromorpha binghamiae* from Wan Do and *Hizikia fusiforme* from Wan-Do. The inhibitory glucose transport effects of selected samples on Caco-2 cell assay system was similar to those of BBMV's assay system. *Laminaria japonica* (2000mg/kg) feeding group reduced the body weight and blood glucose level as a result of *in vivo* inhibitory effects of selected samples.

### P11-68

#### Isolation and Characterization of Photoaging Inhibitor from *Eucommia ulmoides*

Jin-Nyoung Ho<sup>1</sup>, Hye-Kyung Kim<sup>1</sup>, Dong-Hoon Shin, Bum Shik Hong and Hong-Yon Cho  
Graduated School of Biotechnology, Korea University,  
<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Hansoo University

Chronic ultraviolet(UV) light, especially UVB causes cutaneous changes such as sunburn, skin aging, and skin cancer. Skin aging can be divided into intrinsic aging and photoaging. UVB irradiation induces the synthesis of matrix metalloproteinases (MMP) which degrade extracellular matrix, that leads to photoaging subsequently. We investigated expression of MMP-1 in human foreskin fibroblast HSF-68 cell line using ELISA assay system for isolation and characterization of photoaging inhibitor, and screened the inhibitory activity of MMP-1 expression in twelve hundred extracts prepared by solvent extraction based on polarity from four hundred kinds of edible plants. Finally we found an appreciable high inhibitory activity in ethyl acetate fraction from *Eucommia ulmoides*. We isolated a compound, showing a single peak on HPLC.

# 건강기능식품의 발전 및 연구 방향

- 일시 / 2003년 5월 24일 (토) 09:00
- 장소 / 이화여대 이화삼성교육문화관 및 SK-Telecom관 컨벤션홀

주 최 / 한국운동영양학회  
한국영양학회  
한국식품영양과학회

후 원 / 한국학술진흥재단  
한국과학기술단체총연합회

협찬단체 / 미국대두협회(ASA)

협 찬 사 /	단일SMC	동아오츠카(주)	바디플래너
	(주)이름라이프	(주)이에스그룹	(주)정 · 식품
	(주)한국애보트	센스위트 코리아 맥스	(주)풀무원
	(주)해찬들	(주)한성식품	(주)농심
	(주)동양제과	혜성과학	

#### Anti-Photoaging Effect of *Eucommia ulmoides* in Human Skin Fibroblasts

Jin-Nyoung Ho<sup>1</sup>, Hye-Kyung Kim<sup>1</sup>, Dong-Hoon Shin, Bum Shic Hong and Hong-Yor Cho.  
Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,  
<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Hansoo University

The aging process of skin can be attributed to intrinsic aging and photoaging. Clinically, naturally aged skin was smooth, pale, and finely wrinkled. In contrast, photoaged skin was coarsely wrinkled and associated with dyspigmentation, and telangiectasia. Photoaging is influenced by several factors, including genetics, environmental exposure (ultraviolet irradiation, mechanical stress), hormonal changes, and metabolic processes (generation of reactive chemical compounds such as activated oxygen species). The influence of the environment, especially solar UVB irradiations have been demonstrated to produce reactive oxygen species (ROS) and induce the synthesis of matrix metalloproteinases (MMP) which degrade extracellular matrix. We investigated expression of MMP-1 in human foreskin fibroblast HS-68 cell line under UVB irradiation using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for selection and characterization of photoaging inhibitor, and A isolated from *Eucommia ulmoides*. Cytotoxic effect was not shown in HS-68 cell line when we treated with A isolated from *Eucommia ulmoides* according to concentration. Furthermore cell viability according to varying degrees of UV exposure times were increased in A compared with control values. Up until now, the most intensively studied dietary antioxidants for prevention of skin photodamage have been vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene. Compared with vitamin C and vitamin E, A isolated from *Eucommia ulmoides* showed similar or higher inhibitory activity of MMP-1 expression.

#### P8-81

##### Isolation and Characterization of Intestinal Glucose Uptake Inhibitor from *Punica granatum*

Soon-Sun Baek<sup>1</sup>, Hye-Kyung Kim<sup>1</sup>, Dong-Hoon Shin, Bum-Shik Hong and Hong-Yon Cho.  
Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,  
<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Hansoo University

Dietary carbohydrates are hydrolyzed and absorbed in the small intestine. Intestinal glucose uptake is mainly performed by the sodium-dependent glucose transporter, SGLT1. Therefore, inhibition of intestinal glucose uptake is beneficial in reducing the blood glucose level for diabetes and controlling weight gain in obesity. By using human intestinal epithelial Caco-2 cell, mice intestinal BBMV and novel fluorescent glucose analog, 2-NBDG, we screened the inhibitory activities of intestinal glucose uptake in six hundred extracts prepared by solvent extraction based on polarity from the two hundred kinds of edible plants. In this study, existence of SGLT1 in the Caco-2 cell were detected by using enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA), Western blot analysis and immunocytochemistry, and regulation activity of SGLT1 protein was measured. In addition, inhibitory effects of extracts of *Punica granatum*, *Diospyros kaki*, *Raphanus sativus* and *Eucommia ulmoides* on intestinal glucose uptake of streptozotocin induced diabetic mice were measured. Particularly an appreciable high inhibitory effect was found in methanol extract of *Punica granatum*. PG-1a isolated from methanol extract of *Punica granatum* was tentatively determined as a phthalic acid-diisononylester or hydroxyl alkyl ester with molecular weight of 418. The present results suggest that *Punica granatum* could play a role in controlling the dietary glucose absorption by inhibiting intestinal transporters as well as reducing blood glucose level.

## **Effects of Oleamide on Choline Acetyltransferase and Cognitive Activities**

Ho-Jin HEO, Young-June PARK, Young-Min SUII, Soo-Jung CHOI, Mi-Jeong KIM,  
Hong-Yon CHO, Yun-Jeong CHANG, Bumshik HONG, Hye-Kyung KIM,  
Eunki KIM, Chang-Ju KIM, Byung-Gee KIM, and Dong-Hoon SHIN

## Effects of Oleamide on Choline Acetyltransferase and Cognitive Activities

Ho-Jin HEO,<sup>1</sup> Young-June PARK,<sup>1</sup> Young-Min SUH,<sup>1</sup> Soo-Jung CHOI,<sup>1</sup> Mi-Jeong KIM,<sup>1</sup>  
Hong-Yon CHO,<sup>1</sup> Yun-Jeong CHANG,<sup>1</sup> Bumshik HONG,<sup>1</sup> Hye-Kyung KIM,<sup>2</sup>  
Eunki KIM,<sup>3</sup> Chang-Ju KIM,<sup>4</sup> Byung-Gee KIM,<sup>5</sup> and Dong-Hoon SHIN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University Seoul 136-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Food and Biotechnology, Hansoo University Seosan 356-820, Korea

<sup>3</sup>Department of Biological Engineering, Inha University Incheon 402-751, Korea

<sup>4</sup>Department of Physiology, Kyung Hee University Seoul 130-701, Korea

<sup>5</sup>School of Chemical Engineering, and Institute for Molecular Biology and Genetics, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received December 2, 2002; Accepted February 24, 2003

We screened 50 Korean traditional natural plants to measure the activation effect on choline acetyltransferase and attenuation of scopolamine-induced amnesia. The methanolic extracts from *Zizyphus jujuba* among the tested 50 plants, showed the highest activity effect (34.1%) on choline acetyltransferase *in vitro*. By sequential fractionation of *Zizyphus jujuba*, the active component was finally identified as *cis*-9-octadecenoamide (oleamide). After isolation, oleamide showed a 65% activation effect. Administration of oleamide (0.32%) to mice significantly reversed the scopolamine-induced memory and/or cognitive impairment in the passive avoidance test and Y-maze test. Injection of scopolamine to mice impaired performance on the passive avoidance test (31% decrease in step-through latency), and on the Y-maze test (16% decrease in alternation behavior). In contrast, mice treated with oleamide before scopolamine injection were protected from these changes (12–25% decrease in step-through latency; 1–10% decrease in alternation behavior). These results suggest that oleamide should be a useful chemopreventive agent against Alzheimer's disease.

**Key words:** choline acetyltransferase; *Zizyphus jujuba*; oleamide; Alzheimer's disease; cognitive impairment

Alzheimer's Disease (AD) is the most common cause of progressive cognitive dysfunction that affecting approximately four million Americans, causing more than 100000 deaths each year with a total annual cost approaching \$70 billion.<sup>11</sup> The reduction of choline acetyltransferase (ChAT, EC 2.3.1.6) activity is related to the degree of dementia and the severity of neuropathological hallmarks of AD. ChAT activity was significantly lower in patients

with AD than in age-matched control subjects in frontal cortex, temporal cortex, hippocampus, and cerebellum.<sup>21</sup> As the cognitive dysfunction and other features of AD are mediated by loss of function at cholinergic synapses in the neocortex and hippocampus, agents replacing lost cholinergic function should be useful in the management of this disease.<sup>31</sup>

ChAT catalyzes the synthesis of acetylcholine (ACh) in cholinergic neurons. The enzyme is a single-strand globular protein synthesized in the perikarion and transported to the nerve terminals probably by both slow and rapid axoplasmic flow.<sup>32</sup> ChAT is present in a high abundance in the cytosol of cholinergic cell bodies. In nerve terminals, about 80–90% is present as a cytosolic protein, a portion of which may be ionically associated with synaptic membranes, whereas the remaining 10–20% of the total enzyme appears to be nonionically bound to the plasma membrane.<sup>33</sup> ChAT is also localized in the cell nucleus, but the mechanisms governing the subcellular distribution of ChAT have not been identified, and the roles that different pools of the enzyme play in regulation of neurotransmitter biosynthesis remain unclear. In spite of the key role of ChAT in neurotransmission, the extremely low amounts and instability of the enzyme in the nervous tissues have limited its biochemical and structural analysis.<sup>34</sup>

One strategy for ameliorating symptoms of AD is the restitution of near normal acetylcholine concentration in the synaptic cleft to improve cholinergic neurotransmission. ChAT activators increased synthesis of ACh to boost the endogenous level of ACh in the brain and thereby to boost cholinergic neurotransmission, resulting in the improvement of cognitive function in mild to moderate AD. In order to find a natural active constituent that has a potent

\* To whom correspondence should be addressed. Fax: +82-2-3290-3429; E-mail: dhshin@korea.ac.kr

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; ChAT, cholineacetyltransferase; ACh, acetylcholine; CNS, central nervous system

**Naringenin from *Citrus junos* has inhibitory effect  
on acetylcholinesterase and mitigating effect on  
amnesia**

Dementia and Geriatric Cognitive Disorders (개제 예정)

# 특허출원



# 예 일 국 제 특 허 법 률 사 무 소

우-135-915 서울 강남구 역삼동 669-17 예일캐트빌딩 / 대표전화 (02)555-1717 / 팩스 (02)555-1784

문서번호 예일 2003-05166

시행일자 2003. 05. 06(화)

수 신 (학)고려중앙학원

참 조 고려대 생명공학원  
신봉훈 교수님

제 목 출원완료보고의 건

선							
결				시			
접	일	자		결			
	시	간					
	수	번	호				
	처	리	과				
	담	당	자				
				공			
				람			

당소에 의뢰하신 하기 건의 출원을 완료하였기에 그 내역을 아래와 같이 알려드립니다.

- 권 리 : 특 허
- 출 원 인 : 학교법인 고려중앙학원
- 출 원 일 자 : 2003년 04월 30일
- 출 원 번 호 : 제 2003-27670 호
- 명 칭 : 유자로부터 나린제닌을 정제하는 방법 및 그 용도
- 심 사 청 구 : 유
- 우선권 주장 : 무
- 조기공개신청 : 무
- 국내우선기한 : 2004년 04월 30일
- 해외출원기한 : 2004년 04월 30일

첨 부 : 1. 출원서류 사본 및 출원번호통지서 각 1부 끝.

대표변리사 · 공학박사 이덕록



관인생략

# 출원번호통지서



□ □ □ - □ □ □

받는사람  
( )  
주소

출원일자  
출원번호  
출원인

점수번호

## 특 허 청 장



919980004617



1011101000000000000



0000101000

사 본  
C O P Y

방 식 심 사 관	당	당	심	사	관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0002

【제출일자】 2003.04.30

【발명의 국문명칭】 유자로부터 나린제닌을 정제하는 방법 및 그 용도

【발명의 영문명칭】 A method for purifying naringenine from citron and the  
use thereof

【출원인】

【명칭】 학교법인 고려중앙학원

【출원인코드】 2-1995-276862-2

【대리인】

【성명】 이덕록

【대리인코드】 9-1998-000461-7

【포괄위임등록번호】 1999-057661-5

【발명자】

【성명의 국문표기】 신동훈

【성명의 영문표기】 SHIN,Dong Hoon

【주민등록번호】

【우편번호】 135-861

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조홍연

【성명의 영문표기】 CHO,Hong Youn

【주민등록번호】

【우편번호】 138-786

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍범식

【성명의 영문표기】 HONG,Bum Shik

【주민등록번호】

【우편번호】 110-530

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 허호진

【성명의 영문표기】 HEO,Ho Jin

【주민등록번호】

【우편번호】 139-243

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이정민

【성명의 영문표기】 LEE,Jeong Min

【주민등록번호】

【우편번호】 611-073

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김미정

【성명의 영문표기】 KIM,Mi Jeong

【주민등록번호】

【우편번호】 122-864

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최수정

【성명의 영문표기】 CHOI, Su Jeong

【주민등록번호】

【우편번호】 120-833

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김혜경

【성명의 영문표기】 KIM, Hye Kyung

【주민등록번호】

【우편번호】 356-706

【주소】

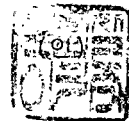
【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다.

대리인

이덕록



【수수료】

【기본출원료】	16	면	29,000	원
【가산출원료】	0	면	0	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	2	항	173,000	원
【합계】			202,000	원

【강면사유】 학교

【강면후 수수료】

101,000 원

【첨부서류】 1. 고등교육법 제2조에 의한 학교임을 증명하는 서류\_1통

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 유자로부터 분리된 저분자성 플라보노이드류인 나린제닌을 유효성분으로 함유하는 아세틸콜린에스터라아제(AChE) 저해용 조성물에 관한 것이다.

유자를 메탄올로 추출한 뒤 감압증류하고, 메탄올 추출물 분말에 에틸 아세테이트를 가하여 물층과 에틸 아세테이트층으로 용매 분획하고, 에틸 아세테이트층에 대하여 전개용매를 클로로포름과 메탄올로 하여 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 및 TLC를 실시함으로써 아세틸콜린에스터라아제(AChE) 저해활성물질인 나린제닌을 수득할 수 있다.

이러한 방법으로 제조된 저분자성 플라보노이드인 나린제닌은, AChE 저해활성능 및 기억, 학습증진 효과를 가지고 있어 노인성 치매 환자나 고령화로 인한 기억력 감퇴현상의 개선제로서 기능성 식품이나 약물에 유용하게 사용될 수 있다.

### 【대표도】

도 1

### 【색인어】

나린제닌, 유자, 치매

# 예 일 국 제 특 허 법 률 사 무 소

우135-915 서울 강남구 역삼동 669-17 예일캐드빌딩 대표전화(02)555-1717/ 팩스(02)555-1784

문서번호 예일 2003-05165

시행일자 2003. 05. 06(화)

수 신 (학)고려중앙학원

참 조 고려대 생명공학원  
신동훈 교수님

제 목 출원완료보고의 건

선 결			지 시	
접 수	일 자		결 재 공 람	
	시 간			
	번 호			
처 리 과				
담 당 자				

당소에 의뢰하신 하기 건의 출원을 완료하였기에 그 내역을 아래와 같이 알려드립니다.

권 리 : 특 허

출 원 인 : 학교법인 고려중앙학원

출 원 일 자 : 2003년 04월 30일

출 원 번 호 : 제 2003-27669 호

명 칭 : 대추로부터 올레아미드를 정제하는 방법 및 그 용도

심 사 청 구 : 유

우 선 권 주 장 : 무

조 기 공 개 신 청 : 무

국 내 우 선 기 한 : 2004년 04월 30일

해 외 출 원 기 한 : 2004년 04월 30일

첨 부 : 1. 출원서류 사본 및 출원번호통지서 각 1부 끝.

대표변리사 · 공학박사 이덕록





관인생략

출원번호통지서



□ □ □ - □ □ □

받는사람 ( )

주소

출원일자

출원번호

접수번호

출원인

특 허 청 장



사 본  
C O P Y

방 식 심 사 관	담 당	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0001

【제출일자】 2003.04.30

【발명의 국문명칭】 대추로부터 올레아미드를 정제하는 방법 및 그 용도

【발명의 영문명칭】 A method for purifying oleamide from jujube and the use thereof

【출원인】

【명칭】 학교법인 고려중앙학원

【출원인코드】 2-1995-276862-2

【대리인】

【성명】 이덕록

【대리인코드】 9-1998-000461-7

【포괄위임등록번호】 1999-057661-5

【발명자】

【성명의 국문표기】 신동훈

【성명의 영문표기】 SHIN,Dong Hoon

【주민등록번호】

【우편번호】 135-861

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조홍연

【성명의 영문표기】 CHO,Hong Youn

【주민등록번호】

【우편번호】 138-786

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍범식

【성명의 영문표기】 HONG, Bum Shik

【주민등록번호】

【우편번호】 110-530

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 허호진

【성명의 영문표기】 HE0, Ho Jin

【주민등록번호】

【우편번호】 139-243

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박영준

【성명의 영문표기】 PARK, Young Jun

【주민등록번호】

【우편번호】 449-760

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김미정

【성명의 영문표기】 KIM, Mi Jeong

【주민등록번호】

【우편번호】 122-864

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최수정

【성명의 영문표기】 CHOI, Su Jeong

【주민등록번호】

【우편번호】 120-833

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김혜경

【성명의 영문표기】 KIM, Hye Kyung

【주민등록번호】

【우편번호】 356-706

【주소】

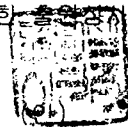
【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원권을 청구합니다.

대리인

이포북



【수수료】

【기본출원료】	16	면	29,000	원
【가산출원료】	0	면	0	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	2	항	173,000	원
【합계】			202,000	원

【감면사유】 학교

【감면후 수수료】

101,000 원

【첨부서류】 1.고등교육법 제2조에의한 학교임을 증명하는 서류\_1통

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 대추로부터 분리된 저분자성 지질류인 올레아미드를 유효성분으로 함유하는 콜린아세틸트랜스퍼라아제(ChAT) 활성화용 조성물에 관한 것이다.

대추를 메탄올로 추출한 뒤 감압증류하고, 메탄올 추출물에 클로로포름을 가하여 물층과 클로로포름층으로 용매 분획하고, 클로로포름층에 대하여 전개용매를 클로로포름과 메탄올로 하여 1차, 2차 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 및 TLC를 실시함으로써 최종적으로 콜린아세틸트랜스퍼라아제(ChAT) 활성물질인 올레아미드를 수득할 수 있다.

이러한 방법으로 제조된 저분자성 지질류인 올레아미드는, ChAT 활성화능 및 기억, 학습증진 효과를 가지고 있어 노인성 치매 환자나 고령화로 인한 기억력 감퇴 현상의 개선제로서 기능성 식품이나 약물에 유용하게 사용될 수 있다.

### 【대표도】

도 1

### 【색인어】

올레아미드, 대추, 치매, 콜린아세틸트랜스퍼라아제

# 예일국제특허법률사무소

우135 915 서울 강남구 역삼동 669-17 예일캐트빌딩 대표전화(02)555-1717/ 팩스(02)555-1784

문서번호 예일 2003-05181

시행일자 2003. 05. 09(금)

수 신 학교법인 고려중앙학원

참 조 고려대 식품생명공학과  
신동훈 교수님

계 목 출원완료보고의 건

선 결			사 시		
접 수 수	일 자		결 재 공 람		
	시 간				
	번 호				
처리과					
담당자					

당소에 의뢰하신 하기 건의 출원을 완료하였기에 그 내역을 아래와 같이 알려드립니다.

권 리 : 특 허

출 원 인 : 학교법인 고려중앙학원

출 원 일 자 : 2003년 05월 06일

출 원 번 호 : 제 2003-28523 호

명 칭 : 두층으로부터 분리한 진피세포 MMP-1 합성억제제  
및 그 정제방법

심 사 청 구 : 유

우선권 주장 : 무

조기공개신청 : 무

국내우선기한 : 2004년 05월 06일

해외출원기한 : 2004년 05월 06일

첨 부 : 1. 출원서류 사본 및 출원번호통지서 각 1부 끝.

대표변리사 · 공학박사 이덕록









919980004617



1011101000000000000

0006085000

사  
C O P Y  
본

방 식 심 사 관	심 사 관	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0001

【제출일자】 2003.05.06

【발명의 국문명칭】 두충으로부터 분리한 진피세포 MMP-1 합성억제제 및 그  
정제방법

【발명의 영문명칭】 Isolation of MMP-1 secretion inhibitor from Eucommia  
ulmoides and its purification method

【출원인】

【명칭】 학교법인 고려중앙학원

【출원인코드】 2-1995-276862-2

【대리인】

【성명】 이덕록

【대리인코드】 9-1998-000461-7

【포괄위임등록번호】 1999-057661-5

【발명자】

【성명의 국문표기】 신동훈

【성명의 영문표기】 SHIN,Dong Hoon

【주민등록번호】

【우편번호】 135-861

【주소】 서울특별시 강남구 도곡동 960 대림아파트 102동 802호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍범식

【성명의 영문표기】 HONG,Bum Shik

【주민등록번호】

【우편번호】 110-530

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조홍연

【성명의 영문표기】 CHO,Hong Youn

【주민등록번호】

【우편번호】 138-786

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김혜경

【성명의 영문표기】 KIM,Hye Kyung

【주민등록번호】

【우편번호】 356-706

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 호진녕

【성명의 영문표기】 HO,Jin Neyong

【주민등록번호】

【우편번호】 142-072

【주소】

【국적】 KR

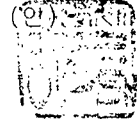
【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사

를 청구합니다.

대리인

이덕복



**【수수료】**

【기본출원료】	16	면	29,000	원
【가산출원료】	0	면	0	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	1	항	141,000	원
【합계】			170,000	원

【감면사유】 학교

【감면후 수수료】 85,000 원

【첨부서류】 1.고등교육법 제2조에의한 학교임을 증명하는 서류\_1통

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 두충으로부터 분리되어 피부 노화와 밀접한 관련이 있는 MMP-1 (matrix metaloproteinase-1)의 합성억제제 및 그 분리방법에 관한 것으로, 이러한 MMP-1 합성억제제인 아우쿠빈은 상기 두충을 상온에서 메탄올로 추출하여 그 잔사를 분획, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피, HPLC 등 일련의 정제공정을 수행함으로써 얻어졌으며, 진피세포(HS68)를 이용한 ELISA 방법 실시로 매우 높은 합성억제 효과를 나타내었고, 이로 인해 피부 노화방지용 기능성식품, 기능성화장품이나 약물에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있게 되는 것이다.

### 【대표도】

도 6

### 【색인어】

두충, 피부 노화, MMP-1, 합성억제제, 아우쿠빈, 진피세포(HS68)

# 예 일 국 제 특 허 법 률 사 무 소

우135-915 서울 강남구 역삼동 669-17 예일패트빌딩 / 대표전화(02)555-1717 / 팩스(02)555-1784

문서번호 예일 2003-05185

시행일자 2003. 05. 09(금)

수 신 학교법인 고려중앙학원

참 조 고려대 식품생명공학과  
신동훈 교수님

제 목 출원완료보고의 건

선 결			지 시		
접 수	일 자		결 재		
	시 간				
	번 호		공 람		
처 리 과					
담 당 자					

당소에 의뢰하신 하기 건의 출원을 완료하였기에 그 내역을 아래와 같이 알려드립니다.

권 리 : 특 허

출 원 인 : 학교법인 고려중앙학원

출 원 일 자 : 2003년 05월 06일

출 원 번 호 : 제 2003-28664 호

명 칭 : 소장내 포도당흡수저해용 식류추출물 및 그 정제방법

심 사 청 구 : 유

우 선 권 주 장 : 무

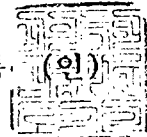
조 기 공 개 신 청 : 무

국 내 우 선 기 한 : 2004년 05월 06일

해 외 출 원 기 한 : 2004년 05월 06일

첨 부 : 1. 출원서류 사본 및 출원번호통지서 각 1부 3.

대표변리사 · 공학박사 이덕록







919980004617



10111010000000000000



0000101000

사 본  
C O P Y

방식 심사 사관	담 당	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2003.05.06

【발명의 국문명칭】 소장내 포도당흡수저해용 석류추출물 및 그 정제방법

【발명의 영문명칭】 Intestinal glucose absorption inhibitor isolated from  
Punica granatum and its purification method

【출원인】

【명칭】 학교법인 고려중앙학원

【출원인코드】 2-1995-276862-2

【대리인】

【성명】 이덕록

【대리인코드】 9-1998-000461-7

【포괄위임등록번호】 1999-057661-5

【발명자】

【성명의 국문표기】 신동훈

【성명의 영문표기】 SHIN,Dong Hoon

【주민등록번호】

【우편번호】 135-861

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍범식

【성명의 영문표기】 HONG,Bum Shik

【주민등록번호】

【우편번호】 110-530

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조홍연

【성명의 영문표기】 CHO,Hong Youn

【주민등록번호】

【우편번호】 138-786

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김혜경

【성명의 영문표기】 KIM,Hye Kyung

【주민등록번호】

【우편번호】 356-706

【주소】

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 백순선

【성명의 영문표기】 PAEK,Soon Sun

【주민등록번호】

【우편번호】 425-181

【주소】

【국적】 KR

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다.

대리인

이덕록





**【수수료】**

**【기본출원료】** 16 면 29,000 원

**【가산출원료】** 0 면 0 원

**【우선권주장료】** 0 건 0 원

**【심사청구료】** 2 항 173,000 원

**【합계】** 202,000 원

**【감면사유】** 학교

**【감면후 수수료】** 101,000 원

**【첨부서류】** 1. 고등교육법 제2조에 의한 학교임을 증명하는 서류\_1통

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 석류로부터 분리되어 당뇨의 유발과 밀접한 관련이 있는 포도당흡수저해제 및 그 정제방법에 관한 것으로 이러한 포도당흡수저해제는 석류의 메탄올 추출물을 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트 순으로 분획한 후 소수성 실리카겔 컬럼 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피 및 HPLC 등 일련의 과정을 거쳐 정제되었으며 추출물, 정제단계의 물질, 정제물 등은 포도당 흡수를 저해하게 되고 이로 인해 혈중 당의 농도가 저하됨으로써 비만 및 당뇨 예방용 기능성식품이나 약물에 유용하게 사용될 수 있게 되는 것이다.

### 【대표도】

도 1

### 【색인어】

석류, 소장, 포도당흡수저해제, 석류추출물