

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0097718 (43) 공개일자 2014년08월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01) A61K 36/21 (2006.01)	(71) 출원인 에키네시아제주허브팜(영) 제주특별자치도 제주시 애월읍 광령리 2567 ()	
(21) 출원번호 10-2013-0009931	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2013년01월29일	부희정	
심사청구일자 없음	제주 제주시 산천단동길 16, 제주생물자원산업화 지원센터 206호 (아라일동)	
	고은영	
	제주 제주시 산천단동길 16, 제주생물자원산업화 지원센터 206호 (아라일동)	
	장지훈	
	제주특별자치도 제주시 아라1동 제주생물자원산업 화지원센터 206호	

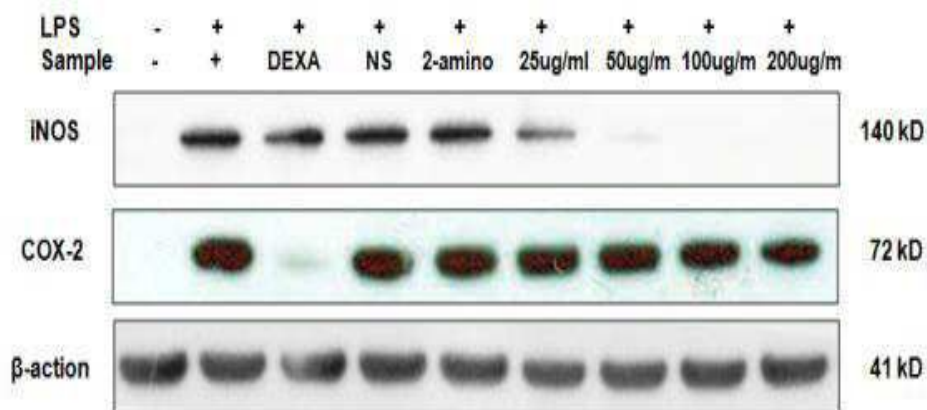
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **아마란스 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증효과를 갖는 건강식품 조성물**

(57) 요약

본 발명은 아마란스(Mastixia arborea C.B.Clarke) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증방지용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명의 아마란스 추출물 또는 이의 분획물은 농도의존적으로 NO 소거 활성 및 iNOS 생성 억제 효과를 나타내어 탁월한 항염증 효과를 가짐으로써, 건강식품의 유효성분, 약학적 조성물 및 노화방지용 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다. 또한 발명의 조성물은 멜라닌 생성을 억제하는 효과뿐만 아니라 영양성분에서도 철분과 칼슘 등의 무기질 영양성분이 우수하고, 두과식물에 부족한 황함유 아미노산 함유 및 스쿠알렌과 토코페롤 성분함유로 성장 및 영양보조식품, 화장품, 약제학적 조성물에 다양하게 적용할 수 있다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

아마란스 지상부 및 종실 추출물 또는 아마란스 지상부 및 종실 추출물의 용매분획을 유효성분으로 함유하는 건강보조식품 조성물

청구항 2

제 1항에 있어서, 아마란스 지상부 및 종실 추출물 또는 아마란스 지상부 및 종실 추출물의 용매분획물을 조성물 전체중량의 0.01 내지 10 중량% 함유하는 것을 특징으로 하는 건강보조식품 조성물.

청구항 3

아마란스 지상부 및 종실 추출물 또는 아마란스 지상부 및 종실 추출물의 용매분획을 유효성분으로 함유하는 항염 화장료 조성물

청구항 4

아마란스 지상부 및 종실 추출물 또는 아마란스 지상부 및 종실 추출물의 용매분획을 유효성분으로 함유하는 염증방지용 약학적 조성물

청구항 5

아마란스 지상부 및 종실 추출물 또는 아마란스 지상부 및 종실 추출물의 용매분획을 유효성분으로 함유하는 항염효과 건강식품

청구항 6

아마란스 지상부 및 종실을 소재로 하는 건강보조식품 조성물

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아마란스(Mastixia arborea C.B.Clarke) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 염증방지용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명의 아마란스 추출물 또는 이의 분획물은 농도의존적으로 NO 소거 활성 및 iNOS 생성 억제 효과를 나타내어 탁월한 항염증 효과를 가짐으로써, 건강식품의 유효성분, 약학적 조성물 및 노화방지용 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

배경기술

[0002] 아마란스는 비름과에 속하는 일년생 유사화곡류로서 식물학적으로 옥수수, 귀리, 벼, 밀과 같은 단자엽 식물이 아니고 쌍자엽 식물이다. 해발이 높고 고온건조한 중앙 남아메리카가 원산지로 페루의 잉카시대와 멕시코의 아즈텍 시대에 옥수수, 완두콩과 함께 주식품원이었다. 크기는 모래알보다 약간 작은 사이즈로 매우 작으며 종자의 형태를 보면 배가 고리처럼 배유를 감싸고 있는 모양을 하고 있는데, 주로 고리 모양의 배에 단백질이나 지방이 축적되어있고 배로 감싸져 있는 외배우에 전분이 축적되어있다. 이삭길이는 보통 20 ~ 60cm 이고 종피색은 황색, 연한살색, 자주색이다. 보통 4월 하순부터 5월 중순사이에 과종하고, 개화기는 보통 6월 하순에서 8월 중하순까지도 품종에 따라 개화기의 다양한 변이를 보이며 초장은 토양비옥도에 따라 달라지나 작은 품종은 120cm 정도 이고 큰 품종은 250cm정도이다.

[0003] 아마란스를 대상으로 항염 및 미백에 관련한 활성 규명에 대한 연구는 보고된 바가 없어 본 발명자들은 제주도에서 재배된 아마란스추출물을 이용하여 염증에 관여하는 NO 생성 억제 및 iNOS와 Cytokine 억제 활성을 측정하여, 아마란스 종실과 자주색 전초에서 우수한 NO 억제 효과와 iNOS 단백질 발현 억제 및 염증관련 TNF- α , IL-6 등의 cytokine 억제 효과가 뛰어남을 확인하였다. 뿐만 아니라 아마란스의 영양성분에 대해 조사한 결과, 타지

방에서 재배된 아마란스에 비해 우수한 영양성분을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [0004]
- [0005] 최근 사회가 급변하고, 여성의 사회진출 등의 여러 가지 요인들에 의해 바쁜 현대인을 위한 패스트푸드 형태의 식품이 넘쳐나고 있다. 이에 따라 소비자들은 충분한 영양성분이 가미되지 않은 식단을 일상적으로 접하게 되고, 그로 인한 각종 불균형 신체 발달 및 질병들이 발병하고 있어 사회적 문제화 되고 있는 실정이다.
- [0006] 인체 질병 및 노화를 유도하는 물질 중에 하나인 nitric oxide(NO)는 대기오염물질이며 담배연기에 포함된 수많은 화학물질중의 하나로서 독성을 가진 매우 불안한 기체이며 고농도에는 세포의 기질적 손상을 초래하는 free radical의 하나이다. Nitric oxide synthase (NOS)는 물리화학적 성질에 따라 Type I, II, III 등 세종류의 동종 효소로 분류된다. 즉, Type I(neuronal NOS, nNOS)과 Type III(endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 지속적 NOS(constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 lipopolysaccharide(LPS), cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 Type II인 inducible NOS(iNOS)이 있다. 이러한 NOS에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 전환되면서 NO가 형성된다.
- [0007] 자극에 유도된 iNOS인 경우 오랜 기간 동안 다량의 NO를 생성하게 되고, 생성된 NO는 guanylyl cyclase의 활성화와 동시에 주위 조직에 세포독성을 나타내는 것이 특징이다. NO는 매우 작으면서도 반응성이 있고 전기적으로 중성이기 때문에 합성된 곳에서 곧바로 확산되어 사방으로 퍼져 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시켜 종양을 유발하는 것으로 알려져 있다(Lee, H. J., Jeong, Y. S., Ryu, S. Y., and Ryu, J. H., "Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cell", *Yakhak Hoeji.*, **1998**, 42:5.). 현재 NO에 대한 많은 연구 보고서들에 의해 생체에서 여러 가지 생리생화학적 현상의 messenger molecule로서 mediator, neurotransmitter 또는 regulator 등으로 다양하게 작용함이 밝혀지고 있다(Kuo, P. C. and Schroeder, R. A. "The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg*", **1995**, 221(3):220-235.). 일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 정상세포의 손상을 초래하여 염증을 유발시키며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다(Weisz, A., Icatelli, I., and Esumi, H., "Regulation of the mouse inducible type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L- arginine", *Biochem. J.*, **1996**, 316: 209.).
- [0008] 염증이 발생하게 되면 림프구(lymphocyte), 대식세포(macrophage), 내피세포 (endothelial cell), 섬유아세포(fibroblast)등 염증반응에 관여하는 세포들이 관여하게 되고 이 세포들이 lipopolysaccharide(LPS), interferon- γ (INF- γ) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α)등의 자극제들에 노출되게 되면 iNOS의 발현이 증가되고 이로 인한 NO 생성이 증가되어 염증반응을 촉진시킨다.
- [0009] 염증반응 시 생겨나는 염증매개 물질들과, cytokine들이 c-Jun의 활성화를 통해 AP-1 전사인자를 활성화시켜 진피내의 무코다당류와 결합섬유들을 분해하는 matrix metalloprotease(MMPs)의 발현을 촉진시키고, 이것의 저해제인 tissue inhibitor of matrix metalloproteases(TIMPs)의 합성을 억제한다고 알려져 있다(Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG, et al. "Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane- associated cytokines", *Arthritis Rheum.*, **1998**, 41: 1748-59.) .
- [0010] 무기질은 신체의 구성과 일부 신체기능을 조절하는 데 필수적인 요소이다. 특히, 칼슘은 뼈와 신경세포를 구성하며, 철분은 적혈구의 혈액소를 구성하는 등 인체의 뼈와 피를 형성함으로써 아동기에서부터 노년기에 이르기까지 인체 성장발육에 아주 중요한 무기질 성분이다.
- [0011] 칼슘은 체내 무기질 중 가장 많은 원소로 인체 내 총 칼슘의 양은 체중의 약 2% 정도로 대부분이 인간칼슘의 형태로 뼈와 치아의 성분을 이루고, 이밖에 혈장 중에 약간 존재하며 근육 및 신경의 기능조절, 혈액응고에 필요하다. 칼슘은 전 생애를 통해 필요하며, 특히 성장기, 임신기, 수유기에는 더욱 많이 필요하고, 성장이나 골다공증 및 관절염과 관련이 있는 중요한 성분이다(이성현, 황보영숙, 김지연, 이연숙, 칼슘급원식품의 체내이용성 연구, 한국영양학회지, 30(5): 499-505, 1997)
- [0012] 철은 미량원소로 헤모글로빈의 성분으로 산소 운반에 관여한다. 따라서 출혈성 질환, 월경개시시기, 임신,

출산, 성장기에는 수요가 높아져 음식의 종류에 주의하지 않으면 결핍되기 쉬운 성분이다(김천수, 홍희옥, 김정윤, 맹원재, 이정숙, 서울지역 여고생들의 식이 철분밀도에 따른 영양섭취상태 및 철분 급원식품에 관한 연구, 한국영양학회지, 40(4): 371-384, 2007). 최근에는 염증성 질환 등 다양한 질병을 예방 및 치료하기 위해 기능성 식품, 기능성 화장품 및 치료제 등 각 분야에서 인공물질이 아닌 천연물질을 이용한 연구가 활발히 진행되어지고 있다. 본 발명자들은 철과 칼슘과 같은 무기질 함량이 우수할 뿐만 아니라, 다른 곡물에 비해 단백질 함량이 우수하고, 스쿠알렌 및 토코페롤과 같은 우수한 성분이 함유되어 있는 아마란스의 항염 효과를 측정하였고 우수한 억제 효능이 있음을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 인체에 무해하고 친환경적인 소재의 활용을 통해 좀 더 안전하고 효능이 우수한 천연물질의 개발을 통해 염증성 질환에 따른 다양한 질병을 예방하고, 건강한 영양성분을 함유한 제품을 개발하여 환자 및 성장기 어린이와 노약자들에게 우수한 영양조성식을 제공함을 목적으로 한다. 또한 본 발명의 또 다른 목적은 아마란스에서는 처음으로 항염효과 및 미백 효능에 대해서도 처음으로 그 기능을 밝힌다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 아마란스를 에탄올과 기타 유기용매들로 추출하여 NO 억제 효과 및 iNOS와 COX-2 단백질 억제 효과, 그리고 cytokine 발현 억제 효과를 갖는 아마란스 추출물을 제공한다. 또한 본 발명은 아마란스의 지상부와 종실 부분을 각각 70% 에탄올로 추출한 다음 유기용매인 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 등의 유기용매를 가하여 다시 추출한 용매분획물을 제공한다. 본 발명의 추출용매로는 에탄올, 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, DMF(Dimethyl foramide), THF(Tetrahydrofuran), 클로로포름, 디에틸에테르 등이 사용가능하고 바람직하기로는 에탄올이 바람직하다.

- [0015] 또한, 본 발명은 아마란스 전초와 종실을 70% 에탄올로 침지시켜 반복 추출하고 농축하여 에탄올 추출물을 얻은 다음 이를 20% 에탄올로 현탁시키고 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올 등의 유기용매를 차례대로 가하여 그에 해당되는 용매 추출분획을 제조한다.

- [0016] 본 발명자는 상기 과정으로 추출 및 분획한 혼합물질이 항염효과 등의 활성을 나타냄을 밝히고, 영양성분 분석을 위해 식품공전법에 의해 아미노산과 무기질 성분을 확인하였고, HPLC 분석 방법으로 스쿠알렌과 토코페롤 등의 함량을 확인하였다.

- [0017] 본 발명의 아마란스 추출물 또는 아마란스 추출물의 용매분획물을 유효성분으로 함유하는 항염효과를 가지는 건강보조식품 조성물은 죽, 선식, 씨리얼, 음료 등의 제형으로 제공될 수 있으며, 본 발명의 아마란스 추출물 또는 아마란스 용매분획물은 건강보조식품 조성물 전체 중량의 0.01 내지 10 중량 % 함유하는 것이 바람직하다. 0.01 중량% 이하 함유시는 본 발명의 염증효과를 기대하기 어렵고, 10 중량% 이상 함유시는 제제화에 문제가 있다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 아마란스 추출물은 항염 효과가 우수하고 특히 아마란스 전초부분은 에탄올 추출물로도 그 효능이 우수하여 앞으로 종실과 전초부분이 다양하게 식품으로 사용할 수 있어 천연식물에서 유래한 안전하고 효과적인 항염효과를 갖는 식품 조성물로 널리 사용될 수 있다.

- [0019] 또한, 본 발명에 의거 얻어진 아마란스 추출물은 식품은 물론 화장품과 의약품 분야에도 널리 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 Western blot analysis를 이용하여 종실에서 분리한 에틸아세테이트층의 NO 생성에 관여하는 유전자들의 억제 효과를 확인한 결과 iNOS를 현저하게 억제하고, COX-2도 농도 의존적으로 억제 효과가 있음을 확인할 수

있었다.

도2는 도2에서 자주색 아마란스 상층부의 에탄올 추출물의 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제를 확인한 결과, 두 단백질 모두 농도의존적으로 현저하게 발현 억제함을 확인하였다.

도3은 아마란스 추출 방법을 나타냄.

도4는 아마란스 지상부 조추출물의 NO 억제효과와 세포 독성

도5는 아마란스 종실 조추출물의 NO 억제효과와 세포 독성

도6은 아마란스 종실 에틸아세테이트층의 NO 억제효과와 세포 독성

도7은 아마란스 지상부 조추출물의 TNF- α 억제 효과

- A: 자주색 아마란스 70% EtOH 추출(100ug/mL),
- B: 자주색 아마란스 70% EtOH 추출(200 ug/mL).
- C: 자주색 아마란스 70% EtOH 추출(400 ug/mL).
- D: 아마란스 혼합물 70% EtOH 추출(100ug/mL),
- E: 아마란스 혼합물 70% EtOH 추출(200 ug/mL),
- F: 아마란스 혼합물 70% EtOH 추출(400 ug/mL)

도8은 아마란스 지상부 조추출물의 IL-6 억제 효과

- A: 자주색 아마란스 70% EtOH 추출(100ug/mL),
- B: 자주색 아마란스 70% EtOH 추출(200 ug/mL).
- C: 자주색 아마란스 70% EtOH 추출(400 ug/mL).
- D: 아마란스 혼합물 70% EtOH 추출(100ug/mL),
- E: 아마란스 혼합물 70% EtOH 추출(200 ug/mL),
- F: 아마란스 혼합물 70% EtOH 추출(400 ug/mL)

도9는 아마란스 종실 에틸아세테이트층의 TNF- α 억제 효과

도10은 아마란스 자주색 전초 에탄올 추출물의 PGE2 억제 효과

도11은 아마란스 종실 에틸아세테이트 추출물의 PGE2 억제 효과

도12는 아마란스 잎과 종실의 단백질 함량

* A : Raw seeds(grinding)

B : Roasted seeds

C : Raw Seeds(do not grind)

D : leaf

도13은 아마란스 잎과 종실의 철 함량

도14는 아마란스 잎과 종실의 칼슘 함량

도15는 아마란스와 다른 곡물의 단백질 함량 비교

도16은 아마란스와 다른 곡물의 철 함량 비교

도17은 아마란스와 다른 곡물의 칼슘 함량 비교

도18은 아마란스 종실의 스쿠알렌 함량

도19는 생 아마란스 핵산추출물의 스쿠알렌 함량

도20은 붉은 아마란스 헥산추출물의 스쿠알렌 함량

도21은 아마란스 종실의 α -토코페롤 함량

도22는 생 아마란스 70% 에탄올 추출물의 α -토코페롤 함량

도23은 붉은 아마란스 헥산 추출물의 α -토코페롤

도24는 아마란스 종실의 β -토코페롤 함량

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 아마란스 지상부 및 종실부분을 각각 70% 에탄올에 침지시켜 반복 추출하여 항염효능을 가지는 아마란스 에탄올 추출물을 얻는다. 또한 아마란스의 에탄올 추출물을 다시 유기용매인 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 등을 이용하여 추출한 후 항염효과를 가지는 추출 분획을 제공한다.
- [0022] 본 발명은 아마란스 상층부 및 종실부를 70% 에탄올로 추출하여 농축한 에탄올 추출물을 이용하여 유기용매로 분획함으로써 항염 효과가 우수한 아마란스 에틸아세테이트 분획을 제공한다.
- [0023] 본 발명은 상기 아마란스 에탄올 추출물을 유효성분으로 하는 항염활성이 있는 조성물을 제공한다. 구체적으로는 상기 추출물은 염증 생성을 억제하여 염증 예방 식품 및 향장품과 의약품 등의 조성물로서 사용될 수 있다.
- [0024] 상기 아마란스 상층부 추출물은 에탄올 조추출물에서 NO 억제 효과 및 iNOS와 COX-2 단백질 억제 효과가 우수하고, IL-6와 PEG2 역시 농도의존적으로 억제해 좋은 염증 억제효과를 보였다. 종실 추출물의 항염 효과는 NO 억제 활성을 이용하여 측정한 결과, 유기 용매 분획 중 에틸아세테이트 분획층에서 가장 좋은 효과를 나타내었다. 또한 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제 효과를 확인하기 위하여 Western blotting을 통해 측정한 결과 에틸아세테이트층에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 농도 의존적으로 억제하고 있음을 확인하였고, 특히 iNOS는 억제 효과가 탁월하게 나타내었다.
- [0025] 또한 본 발명에서는 제주도에서 자란 아마란스의 영양성분을 타지역에 비해 우수함을 확인하고자 식품공전법과 HPLC를 이용하여 측정한 결과 갈습과 칠분에서 월등히 우수한 함량 보유를 확인하였고, 단백질 함량도 비교적 높게 확인되었다. 특히 스쿠알렌과 토코페롤 함량은 타지역에서 자란 아마란스에 비해 월등히 높은 수치를 보여, 제주산 아마란스가 영양적으로 우수하게 식품 및 화장품류나 약품에 다양하게 활용할 수 있음을 확인하였다.
- [0026] <실시 예1 : 아마란스의 지상부로부터 용매분획물의 제조>
- [0027] 본 실험에 사용된 아마란스 전초와 종실은 제주도 어음리에서 재배하여 수확한 것을 사용하였다. 아마란스 전초는 3가지 색상의 아마란스 혼합물과 자주색 아마란스 전초를 가지고 실험하였으며 종실은 분쇄기를 이용하여 분쇄한 것을 사용 하였다.
- [0028] 제주도 애월읍 어음2리에서 재배한 아마란스 전초와 종실을 채취하여 깨끗이 손질한 후 잘게 파쇄 하여 전초는 80% 에탄올로 3L 3회 교반 추출 후 감압 농축하여 15g의 에탄올 추출물을 얻었다. 종실은 80% 에탄올로 5L를 추출 후 감압 농축하여 12g의 에탄올 조추출물을 얻었다. 건조 조추출물 12g을 물 1L로 현탁 시킨 후 헥산 1L를 첨가하여 헥산층을 분리하고, 이것을 2회 반복하여 헥산 분획층을 얻었다. 남은 물층에 디클로로메탄 1L를 가하여 디클로로메탄층을 분리하고, 이것을 2회 반복하여 디클로로메탄 분획층을 얻었다. 남은 물층에 에틸아세테이트 1L를 가하여 에틸아세테이트층을 분리하고, 이것을 2회 반복하여 에틸아세테이트 분획층을 얻었다. 최종적으로 물층에 부탄올 1L를 2회 가하여 부탄올층과 물층으로 분획하여 사용하였다.
- [0029] 아마란스 추출물의 항염 효과를 조사하기 위하여 상기 실시예 1에서 얻은 각 분획물의 항염효과를 NO 억제 효과와 RAW 264.7 세포를 통해 조사하였다.

[0030] <실험 예1 : NO 억제 활성과 세포생존률(LDH) 측정>

[0031] Raw264.7 세포를 10% FBS가 포함된 배지를 사용하여 24 well plate에 1.8×10^5 cells/mL로 분주하고 18시간 뒤, 10% FBS가 포함된 배지에 LPS(1ug/mL)가 포함되지 않은 것 또는 포함한 배지에 추출물을 100, 200, 400 ug/mL로 처리하였고, 아마란스 종실 분획물의 NO생성 억제 능력을 조사하기 위해 위와 같은 조건의 배지에 각각 n-hexan, MC, EA, BuOH, H₂O로 분획한 아마란스 종실 분획물을 200ug/ml로 처리하거나 또는 농도를 세분화(25, 50, 100, 200 ug/ml)한 후에 37℃, 5% CO₂에서 24시간 배양하였다. Raw264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로서 Griess reagentsystem(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96well plate에 각각 분주한 후 제조사에서 제시한 방법대로 Griess 시약을 첨가하여 반응시킨 뒤 540 nm 파장에서 microplate reader(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다.

[0032] 세포생존율을 측정하기 위해 nitrite를 측정하였던 동일한 배지의 상층액을 96well plate에 각각 50ul 씩 분주한 후 LDH 시약 50ul를 분주 후 30분 동안 방치한다. 30분 후에 stop solution을 50ul 넣어 반응을 stop 시킨 후 490 nm 파장에서 microplate reader(BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정한다.

표 1

[0033] 아마란스 지상부의 NO 억제 효과 및 세포 독성

구분	처리 농도(ug/mL)	NO inhibition %	LDH release %
아마란스 3종 혼합	100 ug/mL	13.14	-3.85
	200 ug/mL	16.02	-7.41
	400 ug/mL	38.47	-6.19
자주색 아마란스	100 ug/mL	25.45	-10.42
	200 ug/mL	39.59	-15.55
	400 ug/mL	67.16	-21.47

[0034] 상기 표 1에 나타난 바와 같이 아마란스 조추출물인 상태에서 유효한 NO 억제 효과

[0035] 를 보였다. 특히, 지상부 3종 혼합보다 자주색 단일 추출물이 세포독성이 없는 상태에서 농도 의존적으로 좋은 NO 억제 효과를 확인할 수 있었다.

표 2

[0036] 아마란스 지상부의 NO 억제 효과 및 세포 독성

구분	처리 농도(ug/mL)	NO inhibition %	LDH release %
종실 crude	100ug/mL	17.37	-26.25
n-Hexan		25.71	-6.885
CH ₂ Cl ₂		22.87	-3.302
EtOAc		45.00	-6.393
BuOH		-4.11	-1.268
H ₂ O		-4.38	-3.067

[0037] 상기 표 2에 나타난 바와 같이 종실인 경우 에틸아세트층에서 가장 우수한 NO 억제 효과가 나타남을 확인하였다.

[0038] <실험 예2 : Cytokine (TNF-a, IL-6) 억제 실험

[0039] Raw 264.7 cell을 1.8×10^5 cell/mL의 밀도로 배양하였다. LPS(1ug/mL)로 RAW 264.7 cell을 자극하고 추출물을 여러 농도로 처리하여 37℃ 10% CO₂ 항온기에서 24시간 배양하였다. 24시간 뒤 세포 상층액을 얻어 ELISA법으로 cytokine의 발현을 측정하였다. ELISA는 BD pharmingen (San Diego, CA, USA)에서 Mouse ELISA kit for IL-6, IL-1b, TNF-를 구입하여 시행하였다.

[0040] <실험 예3 : Western blot를 통한 iNOS 및 COX-2 억제 효과 실험>

[0041] Raw264.7 세포를 1.2×10^6 cells/ml의 밀도로 60 mm dish에 분주하고 18시간 뒤 10% FBS가 함유된 배지에 LPS(1 ug/ml)가 포함되지 않은 것 또는 포함한 배지에 아마란스 추출물 50, 100, 200, 400 ug/ml의 농도로 처리한 뒤 24시간 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 24시간 후에 배양액을 제거, 2~3회 PBS로 세척 후 100 μ l의 lysis buffer를 첨가하고, 30분 동안 4℃에서 lysis 시킨다. 30분 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 단백질 농도는 BSA (Bovine serum albumin)을 표준화하여 Protein Assay Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였다. Total cell lysate를 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm X 15well로 크기에 따라 분리한 후, Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, USA)에 200mA로 120분 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS (Tris-buffered saline) + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 3시간동안 실시하였다. 반응이 끝난 뒤에 측정하고자 하는 항체(iNOS 1:2000, COX-2 1:2000, β -actin 1:2000)를 각각 첨가하여 상온에서 2시간 또는 3시간 동안 교반 후 4℃에서 24시간 반응시켰다. 반응시킨 후 TTBS와 D.W로 3회 세척하고 2차 항체 (1: 5000)와 상온에서 3시간 반응시킨 뒤에 TTBS와 D.W로 4~5회 세척하여 ECL 기질(Amersham Biosciences, Piscataway, Nj, USA)과 1~3분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

[0042] <실시 예2 : 아마란스 종실부터 HPLC 분석시료 제조>

[0043] 본 분석에 사용된 아마란스 종실은 제주도 어음리에서 재배하여 수확한 것을 사용하였다.

[0044] 각각의 종실은 가공하지 않은 Raw상태의 시료와 고온에서 볶아낸 것을 사용한 Popping상태의 시료를 사용하였으며, 각각은 Raw, Popping이라 하였다.

[0045] 추출

[0046] ○ 70%EtOH 추출 : 분쇄한 두 가지 상태의 식물시료를 Raw상태의 것은 500g을 Popping상태의 것은 120g을 70%에탄올 각각 5L, 1.2L에 넣고 6일간 추출하였다. 이를 여과한 다음 감압농축기를 사용하여 농축하고 동결건조한 다음 사용하였다.

[0047] ○ Hexane추출

[0048] - Squalene 분석 : 분쇄한 두 가지 상태의 시료를 각각 5g을 헥산 40ml에 넣고 24시간 동안 상온에서 교반시키며 추출하였다.

[0049] - Tocopherol 분석 : 분쇄한 두 가지 상태의 시료를 각각 20g을 헥산 1L에 넣고 혼합하여 30분씩 3회 sonication하여 추출하였다.

[0050] 위의 두 가지 추출물은 여과한 다음 감압농축기를 사용하여 농축하고 동결건조한 다음 사용하였다.

[0051] 시료전처리

[0052] 70%EtOH 추출물은 동결건조한 추출물에 ACN용매를 넣어 100mg/ml의 농도로 제조하여 충분히 섞일 수 있도록 sonication하며, 0.45 μ m의 실린지 필터를 이용하여 여과 후 바이알에 담아 준비하였다.

[0053] Hexane추출물은 동결건조한 추출물에 ACN용매를 넣어 10mg/ml의 농도로 제조하여 충분히 섞일 수 있도록 sonication하며, 0.45 μ m의 실린지 필터를 이용하여 여과 후 바이알에 담아 준비하였다.

[0054] 표준시료의 제조

[0055] Squalene : ACN용매에 녹여 0.1, 0.5, 1mg/ml의 농도로 제조하였다.

[0056] α -Tocopherol : ACN용매에 녹여 0.05, 0.1, 0.5, 1mg/ml의 농도로 제조하였다.

[0057] β -Tocopherol : ACN용매에 녹여 0.1, 0.5, 1mg/ml의 농도로 제조하였다.

[0058] <실험 예4 : Squalene 및 Tocopherol류 분석>

[0059] Squalene분석

[0060] 스쿠알렌 분석을 위한 PDA detector의 파장은 208nm이었다. 이동상으로 사용된 ACN용매는 각각 solvent A와 solvent B에 나눠 담아 50:50의 비율을 사용하였다. 흐름속도는 0.4ml/min이었으며 각각 10분간 running하였다.

[0061] Tocopherol류 분석

[0062] 토코페놀 분석을 위한 PDA detector의 파장은 284nm이었다. 이동상으로 사용된 ACN용매는 각각 solvent A와 solvent B에 나눠 담아 50:50의 비율을 사용하였다. 흐름속도는 0.4ml/min이었으며 각각 10분간 running하였다.

표 3

[0063] 아마란스 종실의 스쿠알렌 및 토코페롤 함량

			Squalene	α -Tocopherol	β -Tocopherol	단위
농림부 연구 보고서	3종 (mean)	Raw	2915	9.3	1.23	ppm
		Germinated	2282	7.63	1	ppm
제주 어음리		A	160	310	100	ppm
		B	80	-	-	ppm
		A'	22800	320	60	ppm
		B'	21800	-	50	ppm

[0064] * A : Raw seeds(70%EtOH추출)

[0065] B : Roasted seeds(70%EtOH추출)

[0066] A' : Raw seeds(Hexans추출)

[0067] B' : Roasted seeds(Hexans추출)

[0068] 상기 표 3에서와 같이 제주 어음리에서 재배 생산된 아마란스는 기존 농림부연구보고서(고영양 곡물자원 아마란스의 유효성분 활용 및 가공제품 개발, 2002년)에서 제시된 경기 지역에서 재배된 아마란스에 비해 스쿠알렌이나 토코페롤 함량이 월등하게 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0069] <실시 예3 : 아미노산 분석 용액 제조>

[0070] 단백질구성 아미노산

[0071] ○ 시스틴, 트립토판 이외의 아미노산 정량용 시험용액

[0072] 단백질로서 약 10 mg을 함유하는 검체를 가수분해 시험관에 정밀히 달아 넣는다. 0.05%(w/v) 2-머캅토에탄올(C_2H_6SO)을 함유한 6 N 염산을 단백질양에 대하여 약 1,000배량 즉, 10 mL를 가한다.

[0073] 드라이아이스에탄올로 동결한 후 탈기장치에 장착하여 용해, 동결을 수회 반복하며 충분히 탈기한다. 봉관하여, 정온가열로에서 $110^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$, 22~24시간 가수분해한다. 가수분해 종료 후 봉관을 절단하여 즉시 감압하여 $40^{\circ}C$ 에서 농축 건조하여 염산을 제거한다. 염산을 최대한 제거하기 위하여 잔사에 물을 가해 다시 농축 건조한다. 0.2 N 구연산나트륨 완충액(pH 2.2) 또는 0.02 N 염산용액으로 일정량으로 만들어 시험용액으로 한다. 침전이 있는 경우에는 멤브레인 필터를 사용하여 여과한다.

[0074] ○ 시스틴 정량용 시험용액

[0075] 단백질 약 10 mg 함유하는 검체를 정밀히 달아 미리 $0^{\circ}C$ 로 냉각시켜 놓은 과개미산 용액 10 mL를가하여 단백질이 가용성인 경우 $0^{\circ}C$ 에서 4시간, 불용성인 경우 $0^{\circ}C$ 에서 하루 밤 방치한다. 방치 후 공기를 흡입하고 소량의 물을 가해 동결 건조한다. 잔사를 0.05%(v/v) 2-머캅토에탄올 함유의 6 N 염산 10 mL를 사용하여 가수분해 시험

관으로 옮긴다. 동결한 후, 탈기장치에 장착하여 충분히 탈기한 후 봉관하여 $110\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 분해한다. 이하 방법은 (1) 시스틴, 트립토판 이외의 아미노산 정량용 시험용액에 따라 시험용액을 조제한다.

[0076] ○ 트립토판 정량용 시험용액

[0077] 단백질을 10 mg을 함유하는 검체를 가수분해 시험관에 정밀히 달아 넣고, 가용성전분 100 mg을 한 다음 4.2 N 수산화나트륨용액 3 mL를 가한다. 동결시킨 후, 탈기장치에 장착하여 충분히 탈기하고 밀봉하여 $135\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 22시간 가수분해한다. 가수분해 후 봉관을 잘라 열고 6 N 염산으로 중화하여 0.2 N 구연산나트륨완충액(pH 4.25)으로 일정량을 만들어 시험용액으로 한다. 용액이 탁한 경우 30,000 ~ 40,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취한다.

[0078] **유리 아미노산**

[0079] ○ 물에 의한 추출

[0080] 고체 또는 페이스트상의 검체에 적용된다.

[0081] 균질한 검체 약 1 g을 정밀히 달아 약 10배량을 물을 가해 비등 수욕상에서 가열하여 응고시킨 다음 여과하여 물층을 취한다. 잔사는 2~3회 소량의 물로 세정하고, 세액은 앞서의 물과 합한다. 지방이 있는 경우에는 에테르로 추출하여 제거한다.

[0082] 물층을 감압하에 농축 건조하여 얻은 잔사를 0.2 N 구연산나트륨 완충액(pH 2.2) 또는 0.02 N 염산으로 용해하여 일정량으로 하여 시험용액으로 한다. 불용물질이 있는 경우에는 멤브레인 필터를 사용하여 여과한다.

[0083] ○ 트리클로로초산법

[0084] 액체상의 검체에 적용한다.

[0085] 검체 1.0 ~ 3.0 mL를 시험관에 달아 16% 트리클로로초산용액을 동용량 가하여 15분간 진탕한다. 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 시험용액으로 한다.

[0086] **<실험 예5 : 아미노산 분석 >**

[0087] **아미노산 자동분석기 조건**

[0088] 완충액, 발색시약의 유무, 칼럼온도의 온도를 점검하고, 자동완충액 전환기구 및 정유량 펌프, 유량을 소정의 조건에 따라 설정하고 측정을 실시한다.

[0089] **정성시험**

[0090] 정성분석을 위하여 표준물질과 시험용액을 동일한 조건에서 분석하여 머무름 시간이 일치하는 성분을 비교 동정한다.

[0091] **정량시험**

[0092] 정량분석의 경우에는 미리 구해 놓은 농도의 아미노산표준의 피크 면적과 함량으로부터 검량 곡선을작성한 다음 시험용액으로부터 얻어진 피크면적으로 시험용액중의 아미노산 함량을 계산한다.

[0093]

[0094] **<실험 예6 : 칼슘 분석 >**

[0095] 과망간산칼륨 용량법은 Ca를 함유하는 용액에 수산염을 첨가해두고, 물에 매우 난용성인 수산칼슘 $\text{CaC}_2\text{O}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 로서 침전시키고 이 침전을 H_2SO_4 에 녹여 용액내의 수산을 KMnO_4 용액으로 적정하여 정량하는 방법이다.

[0096] 무기성분 시험용액 조제에서 얻은 시험용액 중에 40 mL(Ca 1 ~ 12 mg에 대응하는 양)를 200 mL의 비커에 취하여 메틸레드시액 수방울 및 수산암모늄용액 10 mL를 가한 다음 요소 2 ~ 5 g을 가해 녹인다. 비커를 시계접시로 덮

고 약하게 가열을 계속시킨다. 메틸레드시액을 색이 적색에서 등황색으로 (pH 약 5.6) 되었을 때 가열을 중지하고 방냉한다. 이를 2시간 이상(침전이 적을 때는 하룻밤) 실온으로 방치한다. 이때의 액량은 약 20~30 mL 정도이다. 충분히 침전을 형성시킨 후 석출전 수산칼슘 결정을 유리여과기(15AG-4)로 흡입여과하고 세척용 암모니아수 30~40 mL를 수회 나누어 침전과 여과지를 잘 씻는다. 세척이 끝나면 침전 생성에 사용한 비커를 앞의 유리여과기의 밑에 놓고 여과에 사용한 유리봉을 유리여과기에 넣어 미리 70℃ 이상으로 가온한 황산용액(1→25)을 유리여과기에 주입한다. 유리봉으로 교반하여 잠시 방치하고 수산칼슘을 용해한 다음 흡입한다. 다음 흡입을 그치고 가온한 황산용액(1→25) 약 5~7 mL를 유리여과기에 주입하고 유리봉으로 교반하여 내벽을 씻고 흡입한다. 이 조작을 2회 반복한다. 비커를 여과장치에서 들어내고 65~80℃로 가열하여 0.02 N 과망간산칼륨용액으로 적정한다. 공시험에 대하여도 같은 조작을 한다.

$$\text{칼슘}(mg/100g) = (b-a) \times 0.4008 \times F \times V \times 100/S$$

[0097]

[0098]

a : 공시험에 대한 0.02 N 과망간산칼륨용액의 소비 mL 수

[0099]

b : 검액에 대한 0.02 N 과망간산칼륨용액의 소비 mL 수

[0100]

F : 0.02 N 과망간산칼륨용액의 역가

[0101]

V : 시험용액의 희석배수

[0102]

S : 검체의 채취량(g)

[0103]

<실험 예6 : 철분 분석 >

[0104]

Ortho-phenanthroline($C_{12}H_{8n2}$)은 일정 범위의 pH하에서 검체용액 중에 있는 Fe^{2+} 1원자와 O-phenanthroline 3분자가 정량적으로 반응하여 적색의 착화합물 $[(C_{12}H_{8n2})_3Fe^{2+}]$ 을 생성한다. 이 적색의 농도는 Fe 100~200 μ g, pH 2.9~9.0 사이에서 Fe의 농도와 비례하므로 비색정량에 의해 검체 중의 Fe 함량을 구할 수 있다.

[0105]

시험용액의 조제에서 얻은 시험용액중의 10 mL를 피펫으로 25 mL의 메스플라스크에 취하고 같은 10 mL를 시험관(혹은 작은 삼각플라스크)에 취한다.

[0106]

후자는 pH조절용 대조액으로 쓴다. 시험관쪽에는 브롬페놀블루시액 4방울을 가하고 25 mL 메스플라스크 쪽에는 하이드로퀴논용액 1 mL와 또 페난트로린용액 2 mL를 피펫으로 가한다. 구연산나트륨용액을 뷰렛 또는 5 mL 메스 피펫으로 취하여 시험관의 액중에 적가하고 액의 pH가 3.5가 되면 지시액을 가한 액의 색이 황색에서 황록색으로 변하는 점에서 적가를 그치고 이때까지 소요된 구연산나트륨용액의 mL수를 기록한다.

[0107]

이와 같은 용량의 구연산나트륨용액을 메스플라스크 쪽에 가하여 물로 25 mL의 표선까지 희석하여 20℃ 이상의 온도에서 1시간이상 방치한다. 하룻밤 방치해도 무방하다. 일단, 완전히 발색된 액은 적어도 48시간은 퇴색하지 않는다.

[0108]

분광광도계(Spectrophotometer)에서는 510 nm의 파장에서, 광전비색계에서는 녹색필터를 이용해서 발색액의 흡광도를 측정하여 비흡광계수를 구한다. 이것을 미리 작성하여 놓은 검량선과 대조하여 철의 양을 구한다.

[0109]

검량선은 다음과 같이 하여 만든다. 즉, 철 표준액을 물로 정확히 10배로 희석한다. 1, 2, 5, 10, 15 및 20 mL를 각각 1조씩 25 mL의 메스플라스크와 시험관 또는 작은 삼각플라스크에 취한다. 10 mL가 안되는 것은 물을 추가하여 거의 10 mL로 만든다. 상기 발색조작과 동일하게 pH 3.5에서 각 메스플라스크에서 발색시켜 흡광도를 측정하며, 농도 흡광곡선을 작성한다.

[0110]

철(mg/100 g) = $\times V \times 100$

[0111]

A : 흡광곡선에서 구한 철의 양(mg)

[0112]

S : 검체채취량(g)

[0113]

V : 시험용액의 희석배수

표 4

[0114] 아마란스의 칼슘, 철분 및 단백질 함량 분석

항목	국내 연구보고				제주어음리				단위
	농림부 연구보고서	2002년산 경기도 북서부							
	혼합 품종 (Mix)	Raw	Roasting	Popping	A	B	C	D	
단백질	15	14.4	12.3	16.3	16.2	17.6	17.9	20.8	g/ 100g
철	7.5	7.4	8	7.6	46.7	33.4	15.5	1.7	mg/ 100g
칼슘	185	154.8	509.6	492.3	155.6	153.7	319	3544	mg/ 100g

[0115] * A : Raw seeds(grinding)

[0116] B : Roasted seeds

[0117] C : Raw Seeds(do not grind)

[0118] D : leaf

[0119] 상기 표 4에서 제주산 아마란스가 전체적으로 단백질 함량도 우수하고 특히 철분과 칼슘은 타지방에서 분석된 양보다 월등하게 우수한 함량을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다.

표 5

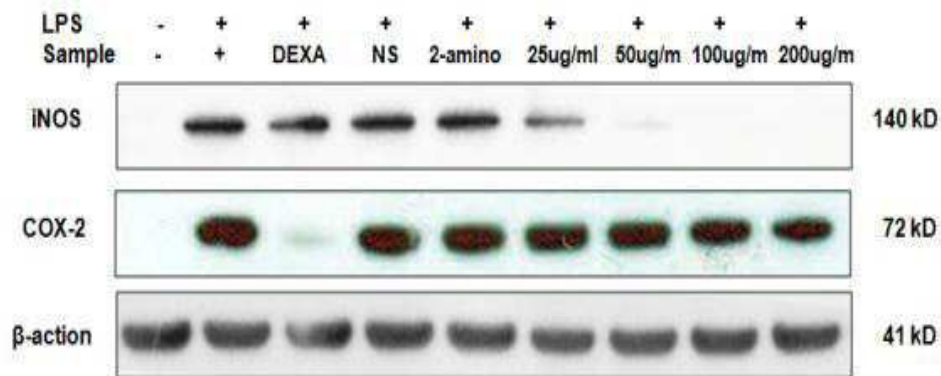
[0120] 다른 곡물과 아마란스의 성분 비교

항목		Protein (g/100g)	Ca (mg/100g)	Fe (mg/100g)
brown rice		7.2	41	2.1
Wheat		12	7	3.2
Barley		10.6	43	5.4
Oats		13	55	4.6
제주 어음리	A	16.2	155.6	46.7
	B	17.6	153.7	66.4
	C	17.9	319	15.5
	D	20.8	3544	1.7

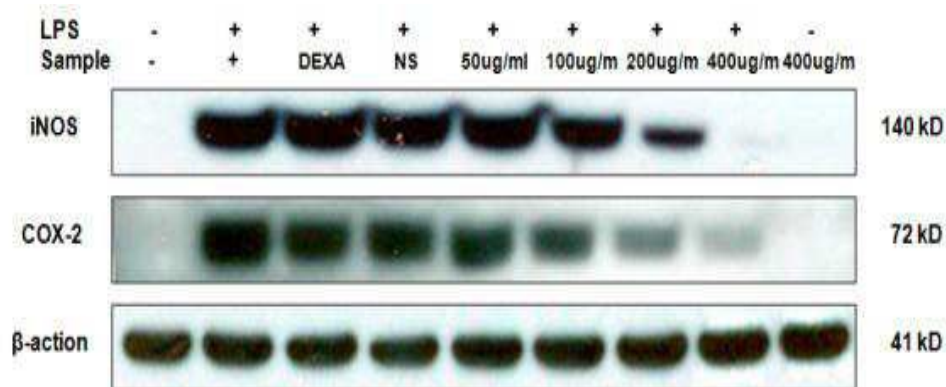
[0121] 상기 표 5에서 제주산 아마란스인 경우 타 곡물에 비해서 단백질, 칼슘, 철분이 모두 우수하게 나타남을 확인하였다.

도면

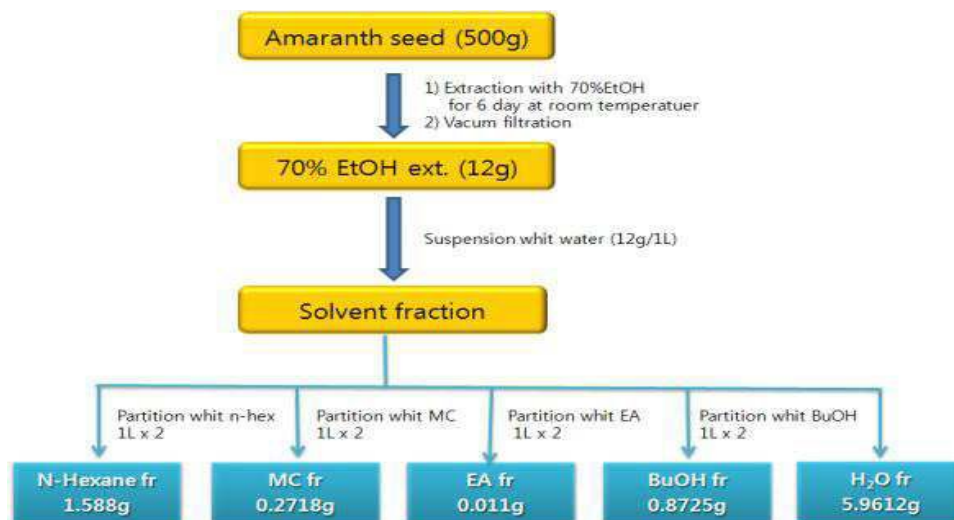
도면1



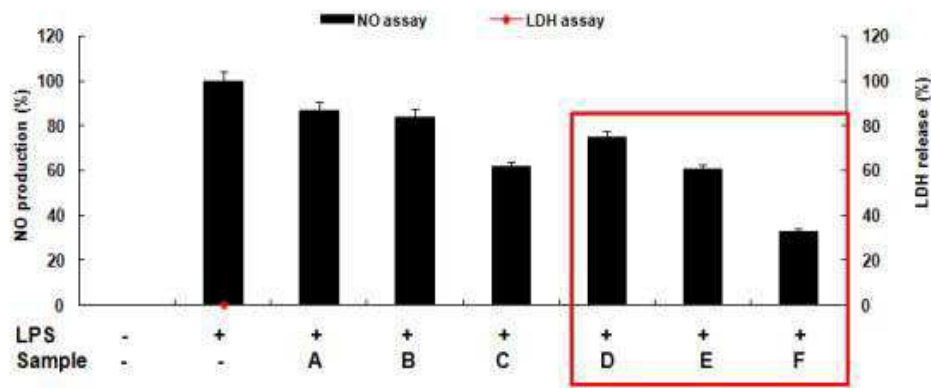
도면2



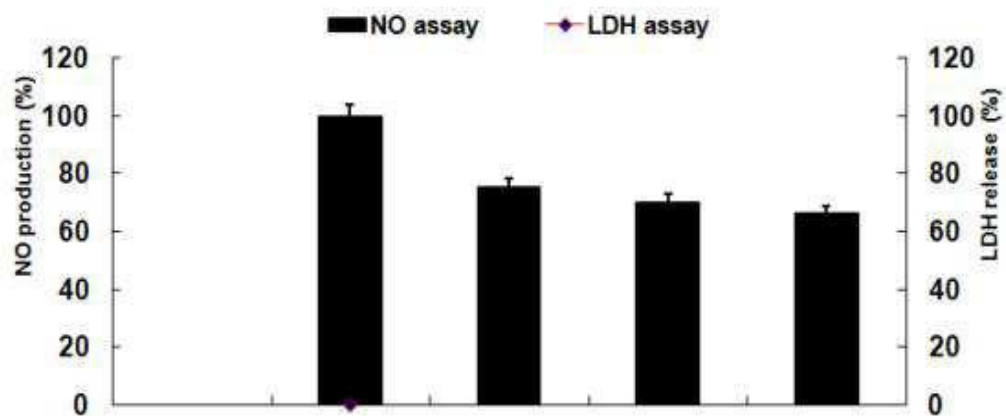
도면3



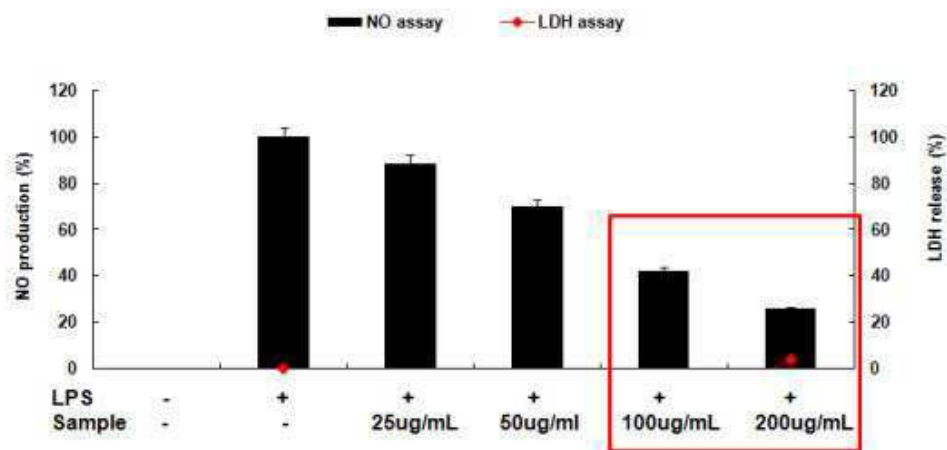
도면4



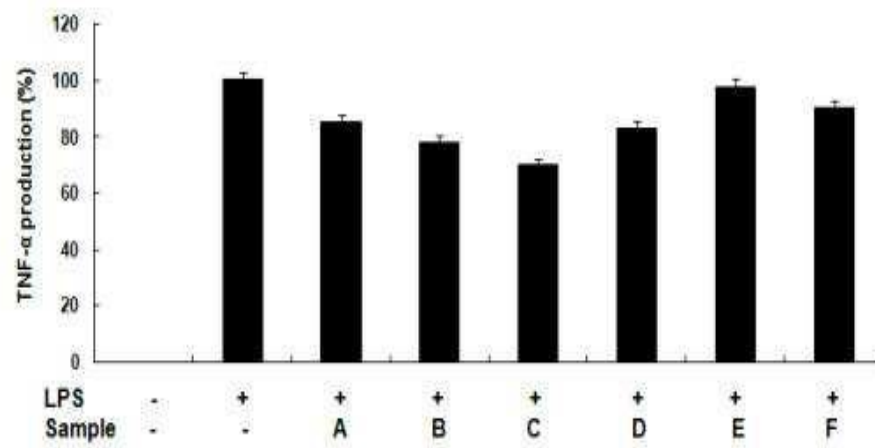
도면5



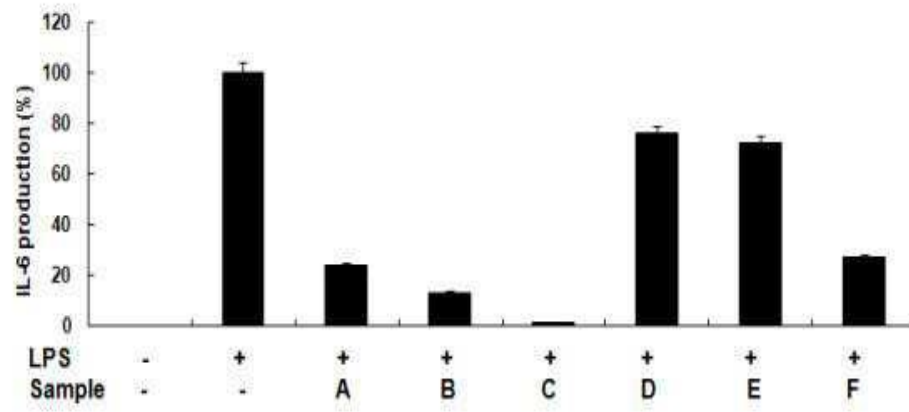
도면6



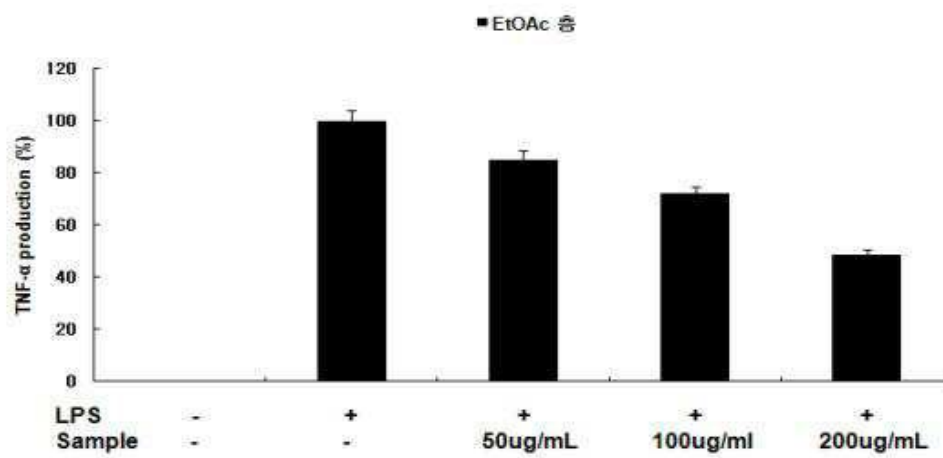
도면7



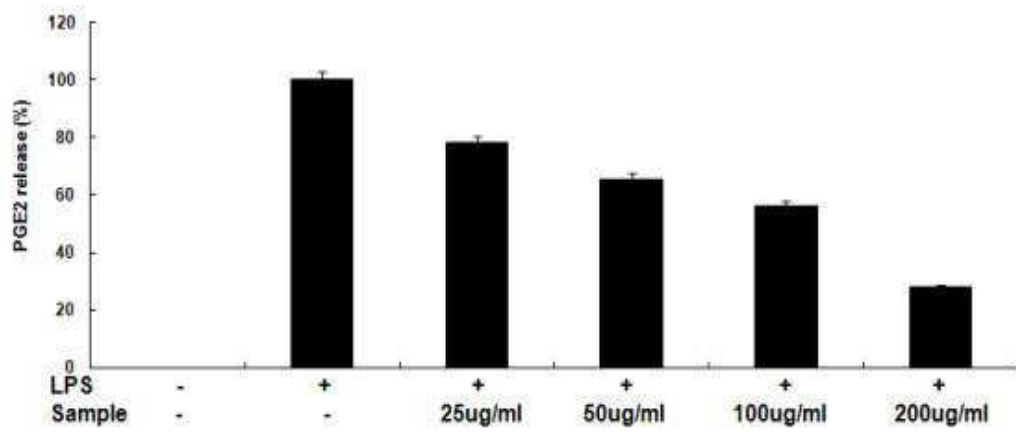
도면8



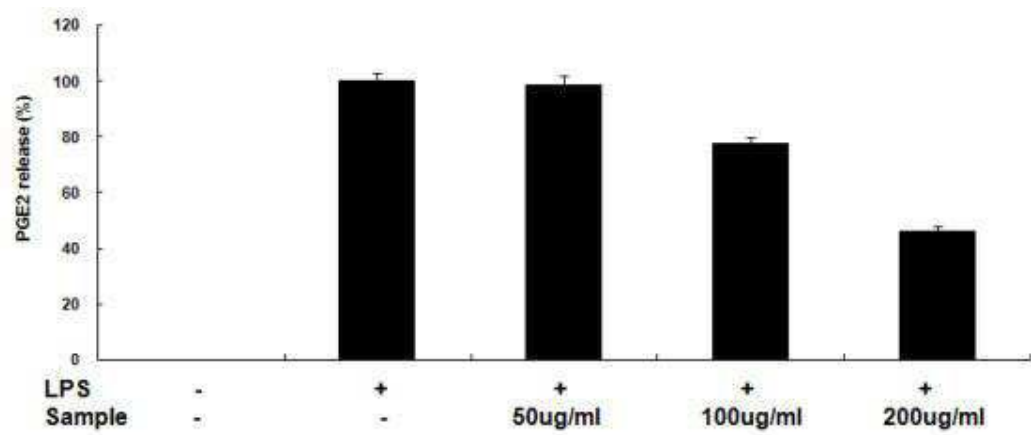
도면9



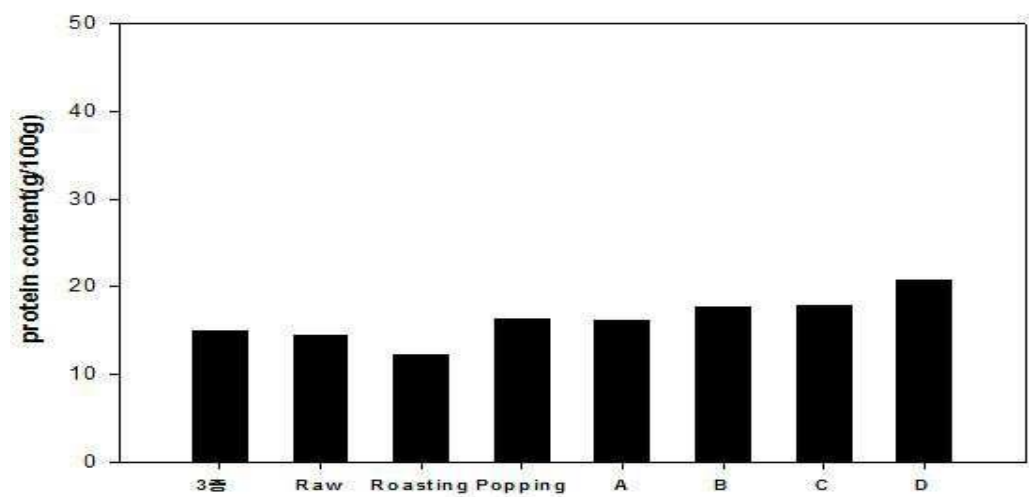
도면10



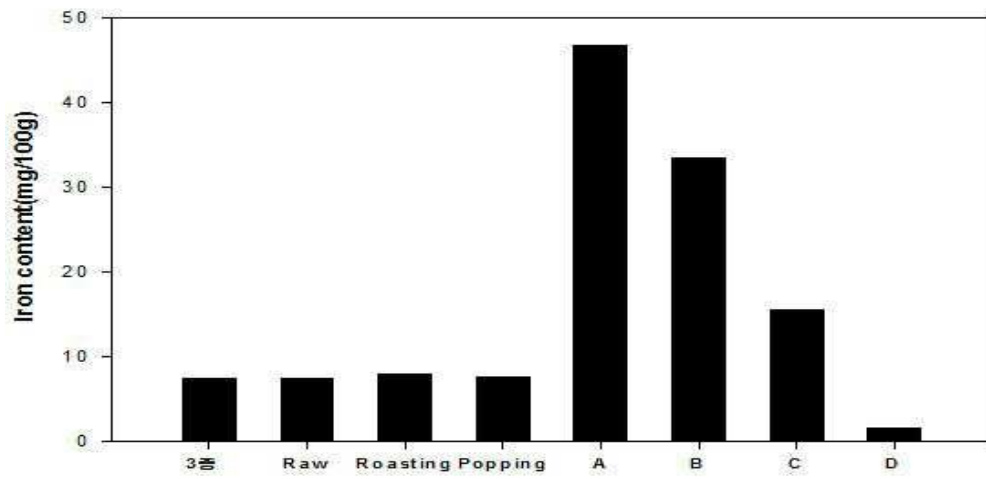
도면11



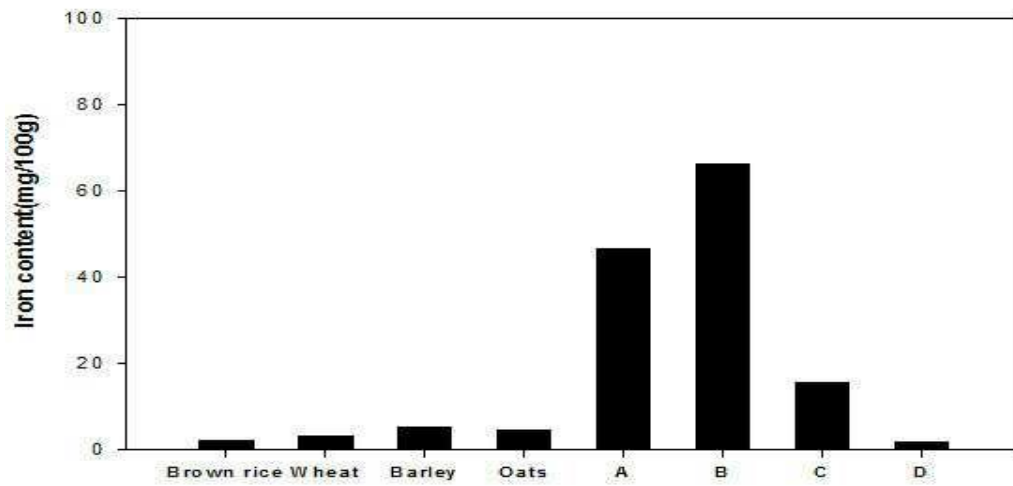
도면12



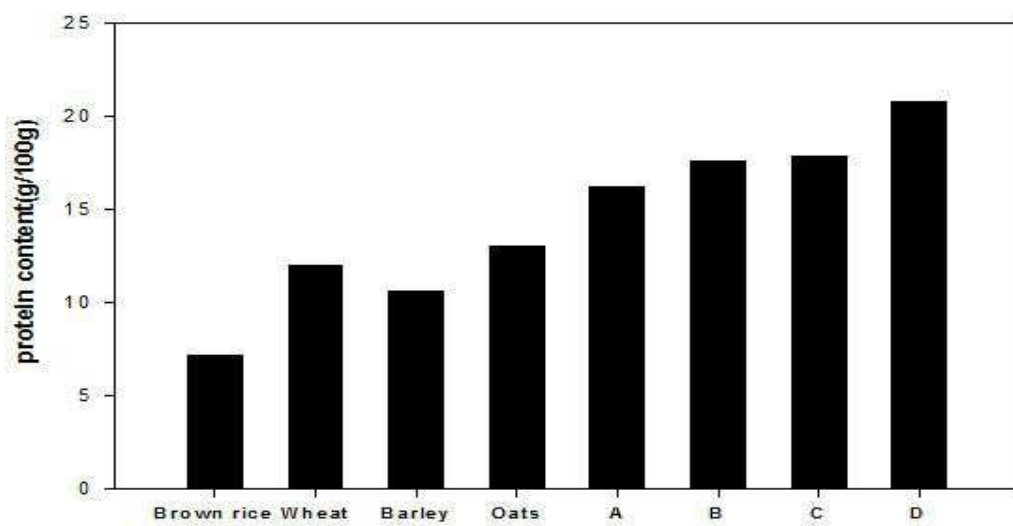
도면13



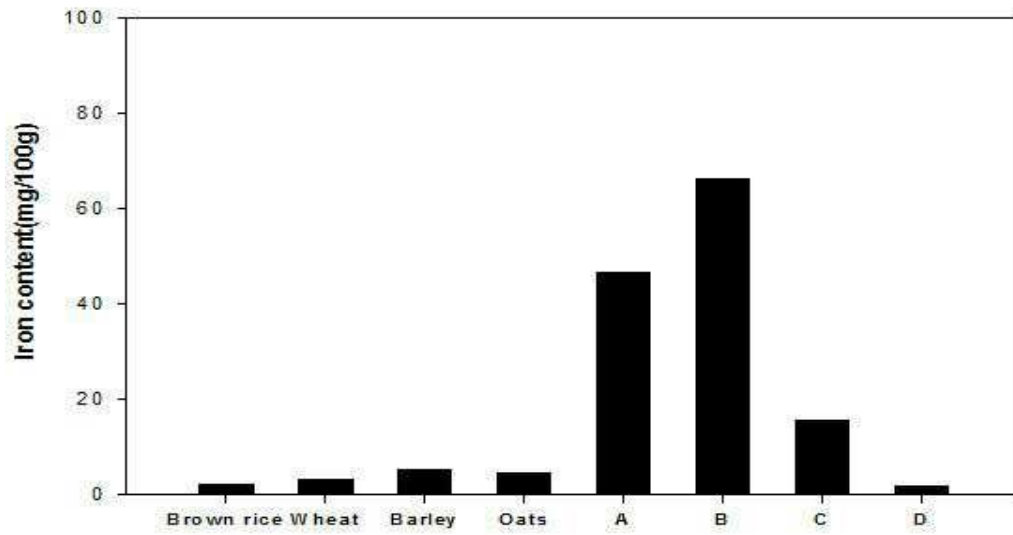
도면14



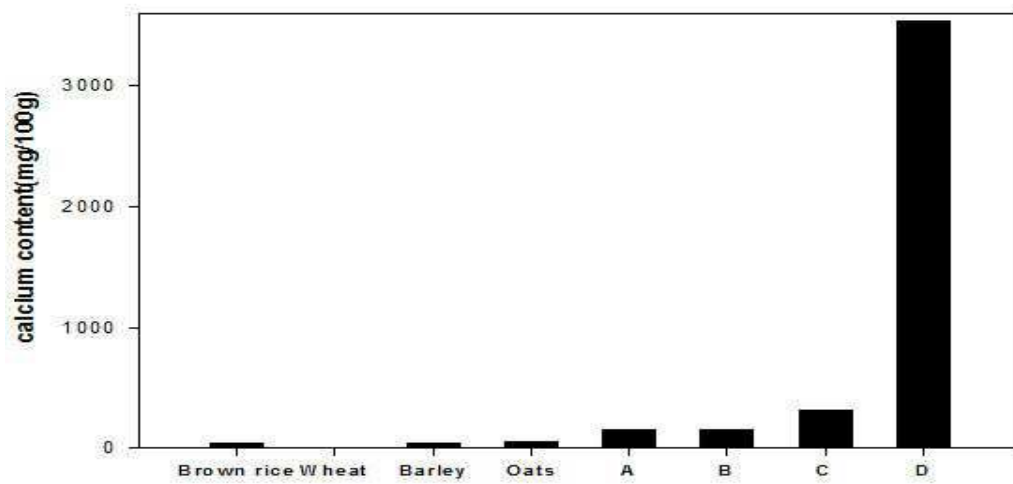
도면15



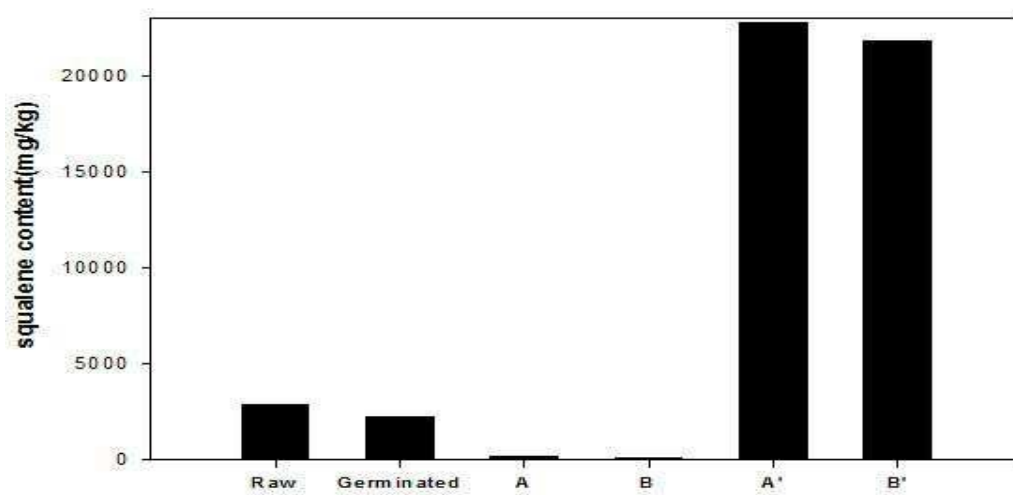
도면16



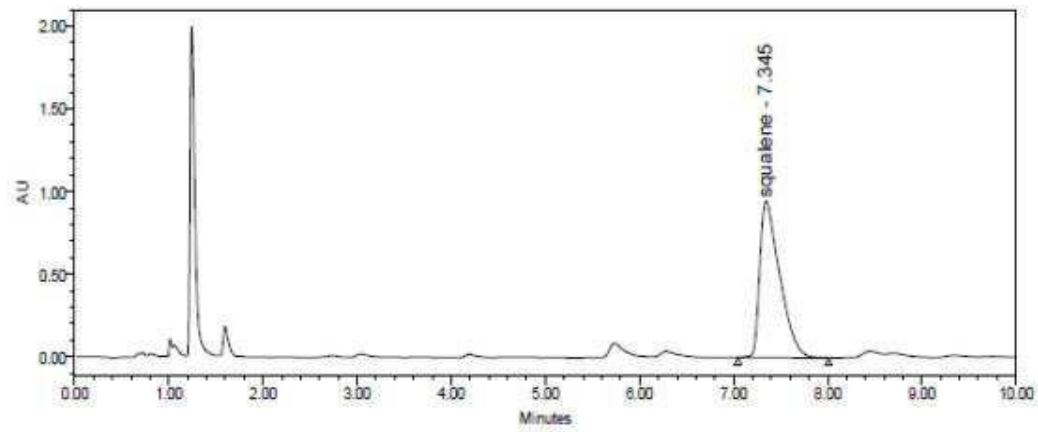
도면17



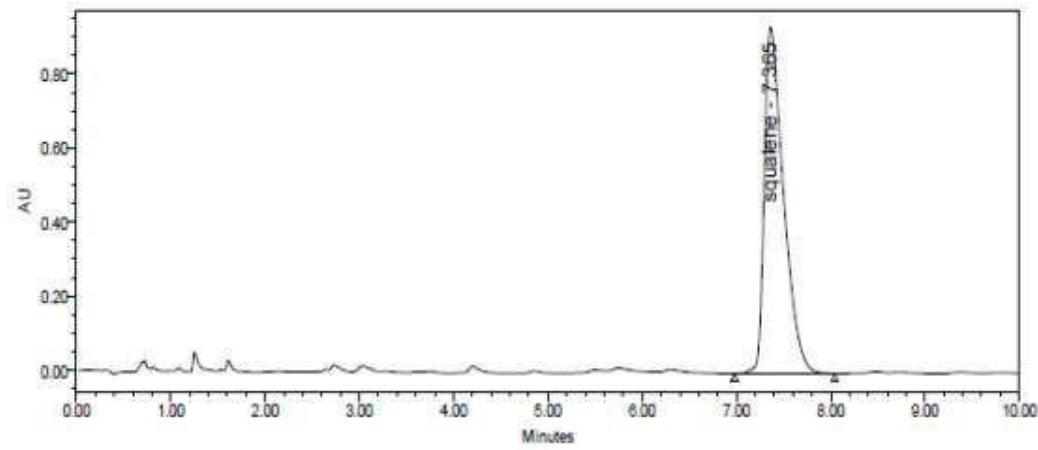
도면18



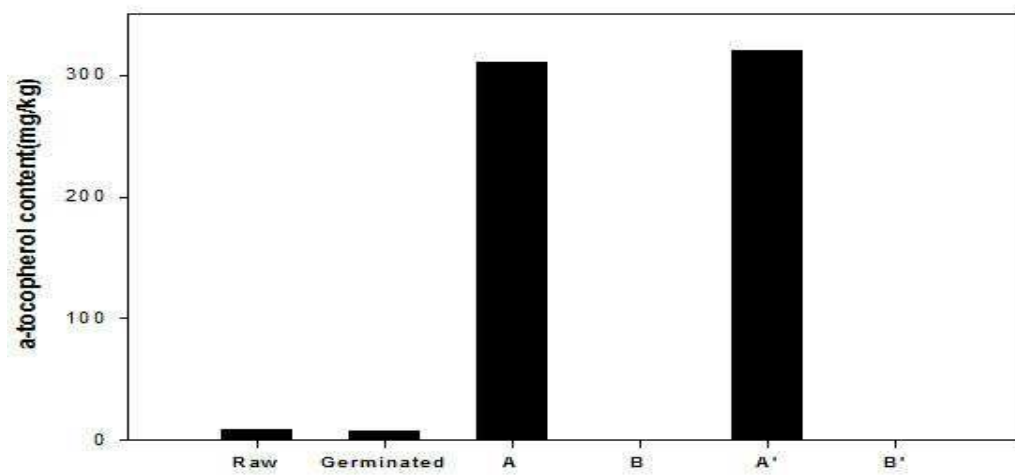
도면19



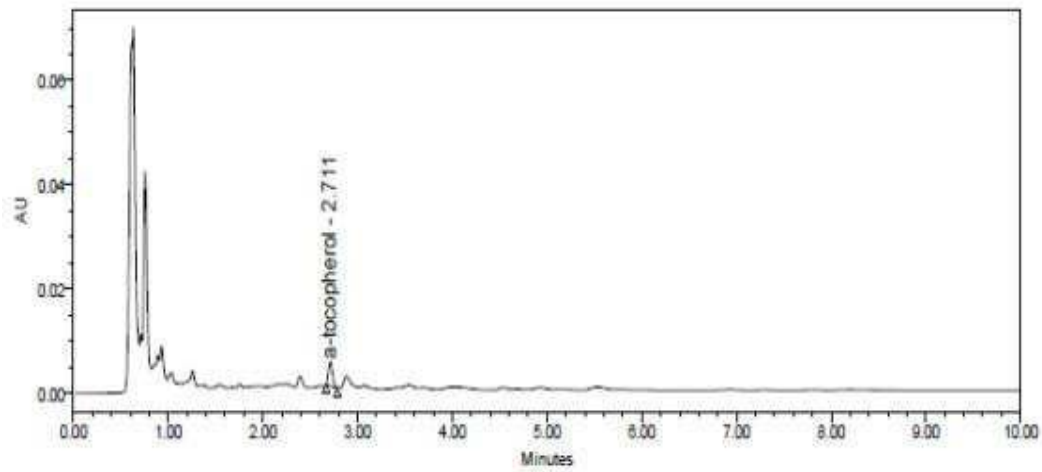
도면20



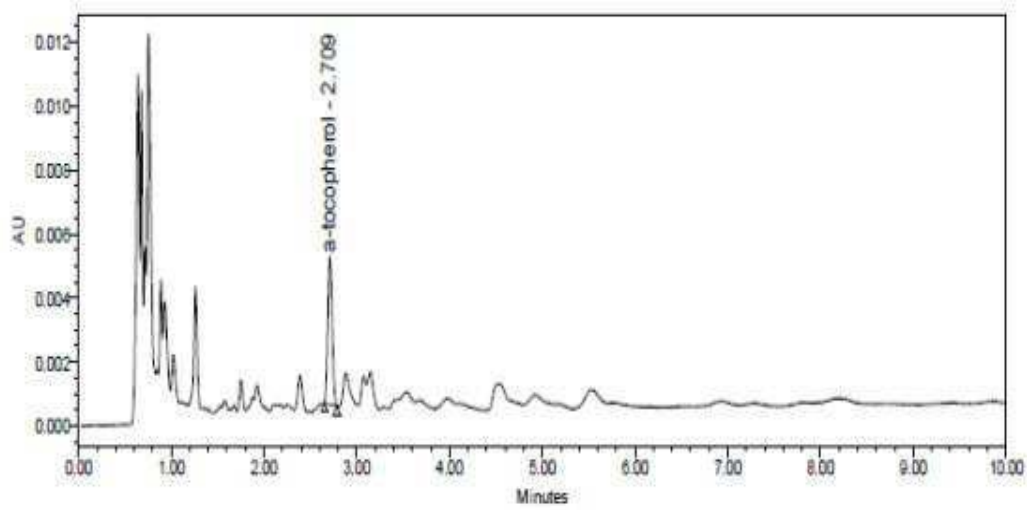
도면21



도면22



도면23



도면24

