(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0038737
(43) 공개일자 2013년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/899 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0103261
(22) 출원일자 2011년10월10일
심사청구일자 2011년10월10일

(71) 출원인
대한민국(관리부서:농촌진흥청장)
경기 수원시 권선구 서둔동 250
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 사림동 9 창원대학교
(72) 발명자
서명철
경기도 수원시 권선구 당진로14번길 37, 202동 1105호 (당수동, 삼정아파트)
우관식
경상남도 밀양시 점필재로 20 (내이동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한라특허법인

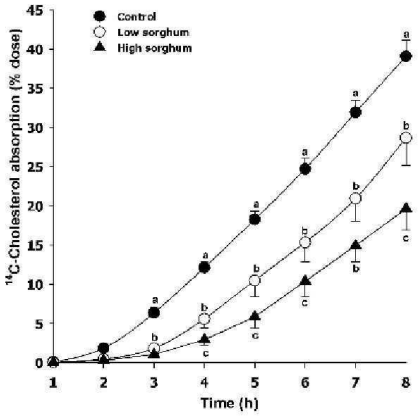
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **소장 지방흡수율 억제 효능이 있는 수수추출물**

(57) 요 약

본 발명은 수수추출물이 소장에서 지방(콜레스테롤과 중성지방 등) 흡수율 억제 작용에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 흰쥐의 생체조건에서 소장흡수율 측정모델(intestinal mesenteric lymph duct-cannulated rat model)을 이용하여 수수추출물이 고지혈증 치료 및 완화 관련 소장 지방 흡수율을 억제하는 효능이 있어 천연소재로 활용할 수 있고 고지혈증 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 소재에 관한 것으로 다양한 응용성을 갖춘 생리기능적인 도정하지 아니한 붉은계열의 수수추출물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

강종래

경상북도 경산시 용성면 고은길 19

이재생

경상남도 밀양시 부북면 오례1길 54

송석보

대구광역시 서구 통학로28길 26-12

오병근

경상남도 밀양시 하송정2길 7, 가동 507호 (내이동, 영생아파트)

고지연

대구광역시 수성구 고산로 162, 107동 701호 (매호동, 한일유앤아이)

곽도연

대구광역시 달서구 조암남로32길 13, 102동 506호 (유천동, 월배쌍용예가아파트)

남민희

대구광역시 수성구 노변로 11, 101동 1503호 (노변동, 노변대백아파트)

노상규

경상북도 경주시 황성로 35-6, 103동 1010호 (황성동, 럭키아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ007513
부처명	농촌진흥청
연구사업명	작물시험연구
연구과제명	저온초미분쇄 잡곡류의 특성평가 및 이용기술개발
주관기관	국립식량과학원
연구기간	2010.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

붉은계열의 수수로부터 추출된 추출물을 유효성분으로 하는 고지혈증 치료 및 소장 지방흡수를 억제하는 약학적 조성물.

청구항 2

붉은계열의 수수를 분쇄하여 유기용매로 유효성분을 추출하고 감압농축 및 동결건조 하는 것을 특징으로 하는 고지혈증 및 소장 지방 흡수억제에 유효한 수수추출물.

청구항 3

도정하지 아니한 붉은계열의 수수추출물을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 및 지방 흡수억제 건강기능식품.

청구항 4

제 3항에 있어서, 도정하지 아니한 붉은계열의 수수추출물을 활용한 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제 또는 음료인 콜레스테롤 및 지방 흡수억제 건강기능식품.

청구항 5

붉은계열의 수수로부터 추출된 추출물을 유효성분으로 하는 소장 지방 흡수율 측정모델(intestinal mesenteric lymph duct cannulated rat model)에 의해 ^{14}C-cholesterol과 중성지방의 소장 흡수율을 억제하는 측정방법.

청구항 6

붉은계열의 수수로부터 추출된 추출물을 유효성분으로 하는 소장 지방 흡수율 측정모델(intestinal mesenteric lymph duct cannulated rat model)에 의해 지용성 비타민 α-토코페놀과 비타민 A의 소장 흡수율 측정방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 도정하지 않은 붉은 계열 수수 추출물의 소장 지방 흡수율 억제 작용에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 생체조건에서 흰쥐의 소장 지방 흡수율 측정모델(intestinal mesenteric lymph duct cannulated rat model)을 이용하여 방사능 동위 원소가 포함된 cholesterol(14C-cholesterol)의 흡수율을 측정하여 도정하지 않은 붉은 계열 수수 추출물의 억제 효과에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 수수(Sorghum, *Sorghum bicolor* L. Moench)는 외떡잎식물 벼목 화본과의 한해살이풀(Kim 등, 2006)로 열대아프리카가 원산지로 건조지대에서 많이 재배되고, 용도에 따라서 곡용수수(grain sorghum), 단수수(sorgo), 소경수수, 장목수수(broom-corn)가 재배되고 있으며, 아시아, 아프리카 및 중미 지역에서 재배되고 있는 주요 식량자원이다. 수수는 쌀, 보리, 밀, 옥수수에 이어 중요한 곡류로서 식이섬유, 페놀 화합물 등의 유효성분이 다량 함유되어 있으며, 페놀 화합물의 대부분은 플라보노이드(flavonoid)로 알려져 있고, 최근 수수의 생리적 기능성에 관한 연구들이 보고되고 있다. 수수는 이유식, 술, 떡, 빵, 엿, 죽 등 새로운 가공식품의 개발에 이용가치가 높음에도 불구하고, 이에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

[0003] 심혈관질환은 인류 질병사의 주요 사망 원인이며 혈액 지방, 특히, 콜레스테롤 및 중성지방의 혈중 농도와 밀접한 관계가 있는 것으로 동물 및 임상실험을 통해서 누차 보고가 되었다. 콜레스테롤혈증(Hypercholesterolemia)은 심혈관질환의 주요 발생인자 중 하나며 곡류, 과채류, 녹차 등과 같은 천연에 풍부하게 존재하는 플라보노이드는 심혈관계를 보호하고 관련 질환을 낮춘다고 알려져 있다.

[0004] 혈액순환계의 지방은 혈액순환계로 유입되는 지방의 종류에 따라 크게 식이성지방(dietary lipids)과 내인성 지방(endogenous lipids)으로 나눈다. 즉, 혈액 지방은, 크게 소장 기관을 통해 유입되는 식이성 지방과, 간 조직

에서 내인성 지방이 생성되어 간외조직(non-hepatic tissues)과의 상호작용 결과로 대사·분배 후에 혈액순환계에 남는 일부 지방, 그리고 담즙분비 경로를 통해서 분비하고 남은 지방들의 합으로, 일종의 이들 조직의 상호작용에 의한 최종산물(a dynamic interplay product)이라 할 수 있다. 혈액순환계의 지방 성분들은 이들 주요 조직의 흡수율이나 분비율 또는 그 대사에 큰 영향을 받는다. 소장 기관은 혈액순환계 지방의 유입통로이고 담즙 분비는 이 혈액순환계 지방의 유일한 배출 경로이기 때문이다. 이러한 관계로 생리적으로 활성을 띄는 페놀화합물과 같은 유효성분이 풍부한 수수추출물을 이용하여 소장 기관을 통한 식이성 지방 유입 억제 작용 연구가 어는 때보다 중요하다 하겠다.

[0005] 수수에 의한 콜레스테롤혈증 효과는, 소장의 흡수 차원에서, 지방의 흡수대사 과정에 억제 현상을 유도하여, 최종적으로 심혈관계 질환 발생 빈도를 감소시킬 수 있음을 제시하는 실험적인 결과가 있다. Cho et al (2003)은 수수 hexane 추출물이 분변을 통한 담즙산 배출을 증가시킨다고 보고하였고 Al-Mamary et al(2001)도 수수의 탄닌은 췌장성 지방분해효소의 활성을 억제한다고 보고하였다.

[0006] 이러한 억제 현상 설명과 관련해서 수수의 콜레스테롤혈증 작용은 위의 많은 연구에서 설명하는 기전인 수수의 우수한 항산화성 만으로는 설득력이 약하며, 오히려 수수에 고농도로 존재하는 폴리코사놀(policosanol)이나 피토스테롤(phytosterol)에 의한 소장에서의 지방 특히, 클레스테롤 흡수율 억제효과나 수수 탄닌(tannin) 의한 콜레스테롤 소장흡수 억제나 또는 담즙산(bile acids)의 회장 재흡수 억제가 더 큰 영향을 주지 않았나 하는 것이다. 그러나 현재까지 수수추출물이 소장 지방 흡수율에 미치는 영향에 관한 연구는 국내외적으로 전혀 보고되어 있지 않다.

[0007] 수수추출물이 소장 지방 분해를 억제할 가능성에 관한 연구와 관련해서 Al-Mamary 등(2001)은 수수 탄닌이 농도 비례적으로 십이지장의 리파아제(lipase) 활성을 억제한다고 보고하였고 Juhel 등(2000)은 위장 및 췌장성 리파아제의 효소활성이 탄닌성분에 의해서 감소한다는 사실을 보고하였다. 또한 Lindahl 등(1997)도 췌장성 포스포리파아제(phospholipase) A_2(PLA_2)의 활성이 대표적인 플라보노이드(flavonoid)인 헤스페레틴(hesperetin)이나 미리세틴(myricetin)과 같은 탄닌에 의해서 억제되는 것을 보고하였다. 지방의 소장 소화 과정에서 이들 효소들의 최적 활성(optimal enzymatic activity)은 지방의 흡수에 필수조건이기 때문에, 만약 이들 효소들에 의한 지방의 소화 및 분해 작용이 지연 또는 감소되면 연속적으로 소장강(small intestinal lumen)의 미셀(micelle) 형성이 감소되어, 클레스테롤을 포함한 식이성 지방의 소장 세포벽 진입 및 연이은 세포내 재합성(cellular esterification & re-synthesis)이 억제되어 최종적으로 흡수가 억제될 가능성이 크다 하겠다. 이러한 점들을 고려해 볼 때, 수수추출물이 소장 지방 흡수에 억제적으로 작용할 가능성이 충분하다 하겠다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명은, 수수추출물을 이용하여 다양한 분야에서 시도되고 있는 콜레스테롤혈증이나 트리아크릴글리세롤혈증(hypertriacylglycerolemia) 치료 및 완화와 관련 소장 기관에서 식이성 지방의 체내 유입을 억제하는 것을 증명하고자 한다. 따라서 본 발명은 붉은 계열의 수수를 용매 추출하여 추출물 형태로 식이적 양 수준에서 공급하였을 때 주요 지방의 소장 흡수를 어떻게 억제하는지 규명하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 수수추출물이 소장 지방 흡수율에 영향을 미치는지를 관찰하기 위해서 소장흡수율 측정모델(intestinal mesenteric lymph duct-cannulated rat model)을 사용하였다. 이 모델은 지방의 소장분해 및 흡수 과정에서 외인성 성분 또는 식이적인 요인과 지용성 성분(lipophilic compounds)의 상호작용 연구 수단으로써, 오랫동안 소장흡수생리학(gastrointestinal physiology)을 이용한 신약 개발 분야에서 응용되어져 왔다. 이 방법은 동물모델인 흰쥐가 살아있는 상태에서, 위장(stomach)이라든지, 담관(bile duct), 췌장(pancreas), 십이지장(duodenum), 소장 및 소장 림프 시스템(lymphatic system)의 상호 유기적으로 관련된 흡수생리(gastrointestinal physiology) 기능을 거의 손상을 입히지 않고, 마취상태에서 미세수술법(micro-surgery under anesthesia)으로 위장을 통하여 십이지장으로 연결된 주입관(gastric tubing)과 림프 순환관(lymphatic circulation)에 설치된 지방채취관(lymph duct cannula)을 연결 봉합한 후, 일정 회복시간을 가진 후에 8시간 동안에 각각 식이적인 영향(dietary approach)과 이에 반응하는 흡수율을 각각 실험적 변수로 둠으로써 소장의 지방 흡수율을 직접적으로 측정하는 생체 모델이다.

[0010] 이 모델을 이용하여 2004년도에 미국특허를 획득하기도 하였다(United States Patent No. US 6,727,277; Date

of Patent: April 27, 2004. Compounds affecting cholesterol absorption; Duy H. Hua, Sung I. Koo & Sang K. Noh).

[0011] 이 모델을 이용하여 추출물의 형태로 연구한 한 대표적인 예를 들자면 사람이 마시는 1-2컵의 녹차에 해당하는 추출물의 양으로, 콜레스테롤의 소장흡수가 농도비례적(dose-dependent manner)으로 감소하는 연구 결과가 있다(도 1).

[0012] 지금까지 알려진 이론과 본인의 연구 경험들을 바탕으로 다음의 연구목표를 설정한다. "수수추출물이 흰쥐의 소장지방흡수율 측정모델(intestinal mesenteric lymph duct-cannulated rat model)에서 ^{14}C-cholesterol과 중성지방의 소장 흡수율을 억제한다"라고 정한다. 이는 본 실험조건에서 국내외적으로 시도가 된 바가 없으며, 수수추출물이 식이성 지방의 소장흡수율에 미치는 영향을 점검하는 최초의 동물생체실험이다.

발명의 효과

[0013] 본 실험 자료는 수수추출물이 고지혈증 치료 및 완화와 관련된 소장 지방 흡수율을 억제하는데 효과적인 천연추출물이란 것을 설명하는 정량적인 데이터이다. 또한 상기 수수추출물은 고지혈증 치료에 효과적이며 다양한 응용성을 갖춘 생리기능적인 추출물이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 수단 설명의 한 예로써 녹차(green tea)추출물에 의한 ^{14}C-cholesterol(^{14}C-CH)소장흡수율 억제현상을 설명하는 그림이다. GT0, 0.0 mg GT추출물; GT1, 42.9 mg GT; GT2, 120.5 mg GT(20).

도 2는 8시간 동안의 수수추출물이 ^{14}C-cholesterol의 소장 흡수율에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 3은 8시간 동안 수수추출물이 α-토코페놀(αTP)의 소장 흡수율에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 4는 8시간 동안 수수추출물이 레티놀(ROH)의 소장 흡수율에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 5는 8시간 동안 수수추출물이 인지질(PL)의 흡수율에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0016] 실험예 1 : 수수추출물(sorghum extract) 추출

[0017] 동물실험에 사용된 수수추출물(sorghum extract)은 국립식량과학원 기능성작물부에서 재배 및 수확한 것으로 종자 상태의 수수 1.000g를 Pin-type Mill(DK201, Sejung Tech, Daegu, Korea)을 이용하여 4,600rpm으로 분쇄하여 일정량을 80% 메탄올로 50℃에서 24시간동안 3회 진탕추출(Wise Cube WIS-RL010, Daihan Scientific Co., Ltd., Seoul, Korea) 한 다음 여과하여 감압농축(Eyela N-1000, Tokyo, Japan) 및 동결건조(FDT-8612, OPERON, Kimpo, Korea)하여 40g를 얻고 -20℃C 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다.

[0018] **실험예 2 : 동물, 식이 및 사육 조건**

[0019] 동물실험에 사용된 식이는 미국영양학회(AIN)가 추천하는 표준식이인 분말화 된 Dyets Inc.(Bethlehem, PA, USA)의 AIN-93G 식이를 중앙실험동물㈜을 통하여 구입하여 사용하였다. 이 식이의 미네랄 함량은 계란 흰자 대체로 조정이 되었으며, 지방은 대두유를 사용한 표준식이로 사육하였다. 식이조성은 표 1과 같다.

표 1

[0020]

구성 요소	함량 (g/kg)	구성 요소	함량 (g/kg)
계란 흰자	200.0	미네랄 믹스	35.0
옥수수전분	528.5	비타민 믹스	10.0
결정포도당	100.0	비오틴	4.0
섬유소	50.0	타타르산수소콜린	2.5
대두유(0.02% tert-butylhydroauinone)	70.0		

[0021] 흰쥐 흡수 실험모델 개발에 사용된 동물은 male Sprague-Dawley rat(Harlan Sprague Dawley, Inc, 중앙실험동물)이며, 최초 평균 체중은 250.6g이었으며, 창원대학교 식품영양학과 동물사육실(실내온도 22±2℃, 상태습도 55±5%, 12시간 light-dark cycle)에서 자동급수장치가 겸비된 개인별 cage로 자유롭게 공급된 증류수와 상기한 표준 식이를 동물 수술 시까지 공급하였다.

[0022] 실험예 3 : 지방흡수관 우회수술

[0023] 평균 체중이 약 300g 안팎의 흰쥐 15마리가 그룹 당 5마리씩 지방흡수관 모델 개발에 이용되었다. 본 연구책임자의 이전 연구들(Noh et al., 1999; Noh et al., 2001a & 200b ; Loest, 2002; Noh et al., 2003a & 2003b; Noh et al., 2004; Shu & Noh, 2006; Zou et al., 2005)에서 상세히 기술된 소독(antiseptic) 조건에서(도 1), 개별 동물들은 실험 당일 한 마리씩 기화기(isoflurane/oxygen)에 의해서 마취가 유지된 후, 복부(abdominal midline)를 절개하였다. 림프시료 채취관과 십이지장 주입관 연결 수술에 마리당 약 40분이 소요되었다.

[0024] 림프관 미세수술법(lymph duct cannulation microsurgery)에 따라, major mesenteric lymph duct로 PE(polyethylene) 튜빙(림프시료 채취관 SV 31, USA) 삽입한 후 고정하였다. 지방 섭취 시, 소장으로 유입되는 식이성 지방은 소장에서 이 림프(lymph) 관으로 유입된다. 그래서 본 실험에서 이 우회관은 흡수실험 동안 소장을 통하여 흡수되는 지방을 직접적으로 정량하고 각종 지방 성분을 분석하기 위한 림프(lymph) 시료를 얻기 위한 시료 채취관이다.

[0025] 그리고 십이지장 주입관(intra-duodenal catheter; OD 2.1mm, USA)은 소장의 흡수율을 정량적으로 측정을 위해서, 정밀히 계산되고 미세화 된 지방유화액(lipid emulsion)을 정확히 소장(십이지장)으로 주입하기 위해서 위장을 통한 소장 상부, 즉 십이지장으로 넣기 위해서 삽입한 일종의 지방유화액 주입관이다. 그래서 이 관은 혈관이 거의 없는 위장의 기저부(gastric fundus)를 통하여 십이지장 4cm 정도에 삽입하여 고정하였다. 이 관들이 고정된 후, 각각의 관(lymph 시료 채취관과 십이지장 주입관)은 옆구리(right flank)를 통해 관통된 후 고정시켰다.

[0026] 그리고 고정케이지(restraining cage)에 수술된 동물들을 제한한 후, 약 30℃로 유지된 회복실(recovery chamber)에서 약 20시간의 회복시간을 가진 후에, 생체상태 하에서 생체내 실험(in-vivo)을 실시하였다. 이 회복기간 동안 5% 글루코오스(glucose)가 포함된 PBS(phosphate buffered saline; 6.75mM Na_2HPO_4, 16.5mM NaH_2PO_4, 115mM NaCl, and 5mM KCl, pH 6.4)용액을 지속적으로 설치된 십이지장 주입관(intra-duodenal catheter)으로 시간당 3mL 씩 주입하였다. 5% 글루코오스는 회복을 촉진할 목적으로 사용되었고 PBS 용액은 탈수방지와 무기질 보충용으로 사용되었다. 그리고 다음날 아침, 흡수실험 직전, 정교하게 조성된 지방유화액(lipid emulsion)을 십이지장 주입관(intra-duodenal catheter)으로 시간당 3mL 씩, 총 8시간 동안 24mL 지방유화액을 지속적으로 자동펌프장치(syringe pump, NE-1600, New Era Pump Systems, Inc., NY, NY, USA)에 의해서 주입되었다. 시간당 3mL씩 8시간 주입되는 동안, 림프시료 채취관으로 림프 시료를 동시에 채취하였다. 주입된 지방유화액(lipid emulsion)의 조성은 표 2와 같이 기본 조성은 33.3kBq [^{14}C]-cholesterol(specific activity, 1.9GBq/mmol, Perkin Elmer, Life and Analytical Sciences, MA, USA), 451.8㎛ol triolein (95%; Sigma Chemical), 3.1㎛ol α-tocopherol (all-rac-α-tocopherol, 97%; Aldrich Chemical), 75.4nmol retinol, 396㎛ol sodium taurocholate 및 20㎛ol cholesterol]이다. 농도비례적인 영향을 점검하가 위하여 실험군을 3군으로 나누어 대조군은 수수추출물을 넣지 않았으며, 지방의 흡수율에 어떤 영향을 미치는지를 점검하기 위하여 저농도 수수추출물(low sorghum extract) 투여군은 수수추출물 80mg/8h(10mg/h)를 고농도 수수추출물(high sorghum extract) 투여군은 240mg/8h(30 mg/h)를 지방유화액에 첨가하였으며, 다른 첨가물은 동일한 조건으로 제조하여 투여하였다. 대표적인 식이성 지방으로써, 클레스테롤과 중성지방(triolein)을 사용하였으며 이들 농도는 일반적으로 각 지방의 하루 섭취량(daily intake) 농도 수준에서 계산되었다. α-토코페놀과 레티놀(retinol)은 대표적인 지용성 비타민이다. 영양학적인 측면 외에, 흡수과정에서 지용성 성분의 지용성 정도 즉, 탄소수가 흡수 단계에 어떤 영향을 미치는지를 점검하기 위해서 지표로서 포함하였다.

표 2

[0027]

지방유화액 조성	함량	지방유화액 조성	함량
^{14}C-cholesterol	1.0㎕Ci	α-Tocopherol	3.1㎕mol
Cholesterol	8.0㎕mol	Retinol	75.4nmol
Triolein	451.8㎕mol	Albumin	72.0mg
Na-taurocholate	396.0㎕mol	PBS buffer(pH 6.4)	24.0mL

[0028] 실험예 4 : ^{14}C-cholesterol 방사선 양 측정

[0029] 림프(lymph) 시료로 액체섬광계수기(liquid scintillation counter; Wallac 1414, Perkin Elmer, Inc, Life and Analytical Sciences, MA, USA)를 이용, 방사선 양을 측정하였다. 이때 흡수율은 100㎕L 림프(lymph) 시료당 방사선 양(DPM)을 기준으로 주입한 지방유화액(lipid emulsion) ^{14}C 총 양을 100% 양(dose)으로 하고 체외로 우회된 림프관(lymph cannula)으로 흡수되어 분비된 양(DPM)을 비교, 8시간 동안의 흡수율(% dose/8h)을 계산하였다. 100㎕L lymph 시료를 10mL의 섬광보조액(Ready safe™, Beckman Coulter. Inc., CA, USA)과 혼합한 후 액체섬광계수기를 이용하여 측정하였다. 나머지 림프 시료는 기타 지방 성분 분석 전까지 -70℃에 저장하였다.

[0030] 실험예 5 : HPLC를 이용한 림프액의 α-토코페놀(tocopherol)과 레티놀(retinol) 동시 분석

[0031] 림프 지방은 먼저 100㎕L의 림프 시료로부터 클로로포름 : 메탄올(v/v, BHT 151.3㎕mol/L) 혼합 유기용매 방법으로 추출되었다. Tocol(Matreya, USA)을 내부 표준으로 사용하였으며 유기용매 층을 분리 후, 하층 용매는 N_2 농축기(N-EVAPTM 111, Organomation Associates Inc., MA, USA)를 이용하여 제거되었다. α-토코페놀과 레티놀의 동시 측정은 다음과 같은 조건에서 실시되었다. 사용된 HPLC 칼럼은 40℃로 유지된 역상 칼럼(Alltima C18, 5㎕m, 4.6x150mm, Alltech Associates, Inc., IL, USA)으로, Beckman System Gold software(Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA)을 겸비한 장치에 연결되었다. 이동상은 100% 메탄올(2mL/min)이었고 UV 295nm에서 분석되었다. 총 콜레스테롤 분석은 HPLC를 이용하여 분석하였다(Noh et al., 1999; Noh et al., 2001a & 200b ; Loest, 2002; Noh et al., 2003a & 2003b; Noh et al., 2004; Shu & Noh, 2006; Zou et al., 2005). 림프 인지질 중에 포함된 양은 화학적인 방법으로 측정하였다(Noh et al, 1999).

[0032] 실험예 6 : GC를 이용한 림프액 지방산 분석

[0033] Folch 등의 방법과 Slover 등의 방법에 준하여 림프액의 총지방산을 측정하였다. 100㎕L의 림프액를 취한 후에 cholroform:methanol(v/v, 2:1) 혼합 용매로 추출 후에 2mL의 0.5N methanolic NaOH와 14% BF_3를 첨가하여 메틸화를 유도하였다. 지방산의 분리 및 동정은 GC(Model GC 7890A, Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)와 불꽃이온화검출기(flame ionization detector)를 이용해서 측정하였다. 사용된 column은 DB-23(50%-Cyanopropyl)-methyl polysiloxane; 0.15㎕m, 0.2mm, 60m, Agilent Inc., USA)이며, 분리 온도 조건은 200℃에서 10분, 그 후 1분에 5℃씩 온도를 올려서 4분 후 220℃에서 9분 동안 측정하였다. 사용된 내부 표준(internal standard)은 17:0이었으며, 같은 분석조건의 표준 지방산(Nu-Chek Prep Inc., Elysian, MN, USA)과 비교해서 각 지방산의 양을 계산하였다.

[0034] 실험예 7 : 소장 지방흡수율 억제 효능이 있는 수수추출물의 식품첨가

[0035] 상기 소장 지방흡수율 억제 효능이 있는 추출물 또는 분획물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물 또는 분획물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100㎖를 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있으며, 식품의 종류 및 사용방법에

따라 적절히 조절하는 것이 좋다.

[0036] 실시예 1 : 림프(lymph) 분비율

[0037] 실험동물의 십이지장으로 수수추출물을 포함하는 지질유화액(lipid emulsion)을 지속적으로 8시간 동안 주입했을 때, 동시에 8시간 동안 림프순환계로 유입되는 각종 지방이나 림프의 양은 표 3과 같다. 수수추출물에 의해서 림프의 분비량은 대조군에 비해서 유의적으로 감소되었다. 분비된 양은 대조군에서는 지속적으로 증가하는 경향을 보였으나 실험군에서는 수수추출물에 의해서 증가하는 속도가 수수추출물의 투여량에 상관없이 대조군에서는 증가하는 속도가 감소하는 경향을 보였다. 8시간 동안 총 분비된 림프의 양은 대조군에서 23.08mL이었고, 수수추출물 투여군에서 각각 17.12mL와 14.71mL로 나타났다.

표 3

[0038]

Lymph lipids	대조군	저농도 수수추출물 투여군	고농도 수수추출물 투여군
Lymph (mL/8h)	23.08	17.12	14.71
^{14}C-CH(% dose/8h)	39.08	25.81	19.66
total CH (μmol/8h)	18.44	13.34	10.48
αTP (nmol/8h)	1,184.90	809.00	753.40
(% dose/8h)	37.81	26.05	24.04
Retinol (nmol/8h)	13.60	14.97	19.22
(% dose/8h)	18.04	19.86	25.50
Total FA (μmol/8h)	1,709.00	1,515.00	1,342.00
PL (μmol/8h)	36.45	36.66	36.45

[0039] 실시예 2 : 소장 ^{14}C-cholesterol 흡수율

[0040] 위장을 통한 십이지장으로 수수추출물을 포함하는 지방유화액을 8시간 동안 주입했을 때 소장 림프순환계로 유입되는 ^{14}C-cholesterol의 양(흡수율)은 도 2와 같다. 최초 1-2 시간 사이의 ^{14}C-cholesterol 흡수율은 대조군과 수수추출물 투여 동물군 간에 유의적인 차이가 없었지만, 수수추출물 투여 후 3시간째부터 대조군의 ^{14}C-cholesterol의 흡수율은 급격히 증가하여 증가세를 유지하는 반면에, 수수추출물 투여 동물군의 흡수율은 그 증가세가 유의적으로 서서히 감소되기 시작했고 4시간째부터는 보다 많은 수수추출물을 투여한 그룹에서 증가율이 가장 둔화되어 유의적인 차이로 낮아지는 경향을 보였다. 최종적으로 총 8시간 동안 흡수된 ^{14}C-cholesterol 양을 합산해 비교해보면, 대조군에서는 39.08% dose이었고 저농도 수수추출물(low sorghum extract)군에서는 유의적인 차이로 25.81% dose으로 나타났으며 고농도 수수추출물(high sorghum extract) 투여 동물군에서는 8시간 동안의 ^{14}C-cholesterol의 흡수율이 19.66% dose로 나타나, 수수추출물의 영향으로 소장에서 콜레스테롤의 흡수율을 각각 33.8 및 49.7% 억제하는 것으로 파악되었다(표 3).

[0041] 실시예 3 : 수수추출물이 지용성 비타민 α-토코페놀의 소장 흡수율에 미치는 영향

[0042] 소장(십이지장)으로 수수추출물이 포함된 지방유화액을 주입했을 때 소장의 림프순환계로 유입되는 α-토코페놀의 흡수율은 도 3과 같다. 본 발명에서 α-토코페놀의 흡수율을 함께 측정한 이유는 첫째, 수수추출물이 대표적인 미량영양소(micronutrient)인 비타민 E의 흡수에 어떤 영향을 미치는지 점검함이었고 둘째로는 α-토코페놀의 분자식이 $C_{29}H_{50}O_2$로 위에서 언급한 콜레스테롤과 유사해 분자 구조나 탄소수에서도 상호 유사하고 또한 극지용성이기 때문에서 소장 흡수대사에서 서로 어떤 경향을 보이는지를 비교, 분석하기 위함이었다. 또한 필수 지용성 항산화 비타민으로써 소화흡수과정에서 서로 상호작용이 발생되는지 알아보기 위해서 지질 유화액 속에 포함하였다. 도 3에서와 같이, 2시간대부터 8시간대까지 대조군에 비해서 수수추출물 투여 동물군들이 유의적인 차이로 낮아지는 경향을 보였고 수수추출물의 투여량에 따른 영향은 나타나지 않았다. 8시간 동안 분비된 총 α-토코페놀의 양은 대조군, 저농도 수수추출물, 고농도 수수추출물에서 각각 1,184.9nmol(37.81% dose), 809.0nmol(26.05% dose), 753.4nmol(24.04% dose)로 계산되었다(표 3). α-토코페놀은 상기한 결과에서 알 수 있듯이 지용성 성분이자 콜레스테롤 유사물질이다. 그래서 콜레스테롤과 유사한 흡수경로를 거쳐서 림프순환계

로 흡수된다. 일반적으로 주로 이러한 흡수경로로 인해서 지질성분들과 함께 영향을 받는 경우가 많아 주로 식물성 추출물인 플라보노이드를 포함하는 폴리페놀들에 의한 흡수 억제 경향은 이번 실험에서도 확인되었다. 이 실험 결과가 제시하는 것은 콜레스테롤의 흡수율과 유사하게, 유사한 극지용성인 α-토코페놀도 함께 흡수율이 억제되며 수수를 장기적으로 먹을 시 지용성 미량성분의 영양관리에 특별한 주의가 요망된다고 하겠다. 그러나 수수의 다양한 폴리페놀 성분들은 이 비타민 E 만큼 항산화작용이 있어서 영향을 받은 비타민 E 만큼 충분히 항상화 작용을 대신 할 것으로 기대되며 미흡수된 수수 성분들은 또한 소장 및 대장 환경에서 항상화 환경 보강에도 도움이 될 것으로 판단된다.

[0043] 실시예 4 : 수수추출물이 비타민 A(retinol, ROH)의 소장 흡수율에 미치는 영향

[0044] 수수추출물 투여가 또 다른 미량영양소로써 비타민 A(retinol)의 소장 흡수율에 어떤 영향을 미치는지도 함께 조사되었다. 소장(십이지장)으로 수수추출물이 포함된 지방유화액을 주입했을 때 소장 지방흡수관으로 유입되는 레티놀의 흡수율은 도 4와 같다. 레티놀 흡수율 결과는 클레스테롤 흡수율 결과와 함께 아주 흥미로운 연구결과가 아닐 수 없다. 비타민 A(retinol)의 흡수율을 함께 측정한 이유는 비타민 E와 함께 가장 대표적인 미량영양소에 어떤 영향을 미치는지 점검함이었다. 도 4에서와 같이, 수수추출물을 투여를 시작해서 5시간째까지 그룹간의 비교에서는 차이가 없었으나 6시간째부터 고농도 수수추출물군(high sorghum)에서만 점차 유의적인 차이로 급격하게 흡수율이 증가하기 시작하였다. 8시간 동안 흡수된 총 레티놀양은 대조군, 저농도, 고농도 수수추출물 투여 동물군에서 각각 13.60nmol(18.04% dose), 14.97nmol(19.86% dose), 19.22nmol(25.50% dose)로 나타났다(표 3). 레티놀은 상기한 α-토코페놀과 마찬가지로 대표적인 지용성 비타민이며 림프순환계로 유입되며 다양한 식이성 인자들에 의해서 영향을 받는다. 그런데 예상과는 달리 오히려 수수추출물에 의해서 증가되는 경향을 보인 것은 여러 중요한 의미가 있다. 비타민 A는 세포성장이나 시력기능, 유전자 발현 등에 영향을 미치는 중요한 영양인자이다. 이번 실험 결과가 제시하는 것은 수수추출물은 성인별 질환의 요인인 클레스테롤의 흡수율을 줄이면서 동시에 비타민 A의 중요한 보충원이 될 수도 있다는 것을 의미한다. 이 결과를 바탕으로 응용적인 측면을 살펴보면 상품화나 특허화의 중요한 단서가 될 수 있다고 판단된다. 또한 비타민 A가 필수적으로 필요한 성장기에 청소년이나 노약자에게 중요한 식이적 처방을 설명하는 과학적인 근거가 될 수도 있다고 판단된다.

[0045] 실시예 5 : 수수추출물이 중성지방(fatty acids)의 소장 흡수율에 미치는 영향

[0046] 수수추출물 투여가 대표적인 식이성 지방인 중성지방(triglycerides, 3 분자의 fatty acids와 1분자의 glycerol로 구성) 소장 흡수율에 어떤 영향을 미치는지도 함께 조사되었다. 소장(십이지장)으로 수수추출물과 트리올레인(triolein)이 포함된 지방유화액을 주입했을 때 소장 지방흡수관으로 유입되는 지방산의 흡수율은 표 4와 같다. 대표적인 중성지방으로 트리올레인이 사용되었다. 트리올레인(Triolein) 흡수율은 올레인산(oleic acid)으로 측정되었을 때, 대조군과 저농도 수수추출물 투여 동물군 간에 유의적인 차이가 없었지만, 대조군과 고농도 수수추출물 투여군과는 유의적인 흡수율 감소현상이 나타났다. 최종적으로 총 8시간 동안 흡수된 올레인산(oleic acid) 양은 대조군에서는 1427.3㎛ol/8h이었고 저농도 수수추출물 투여군에서는 1282.4㎛ol/8h로 나타났으며 고농도 수수추출물 투여군에서는 1122.4㎛ol/8h로 조사되었다(표 4). 식이성(triolein)이든 내인성이든 림프순환계로 유입되는 모든 종류의 지방산을 합한 총지방산의 양(total fatty acids)도 올레인산의 흡수율과 비슷한 억제 양상을 보였다.

표 4

[0047]

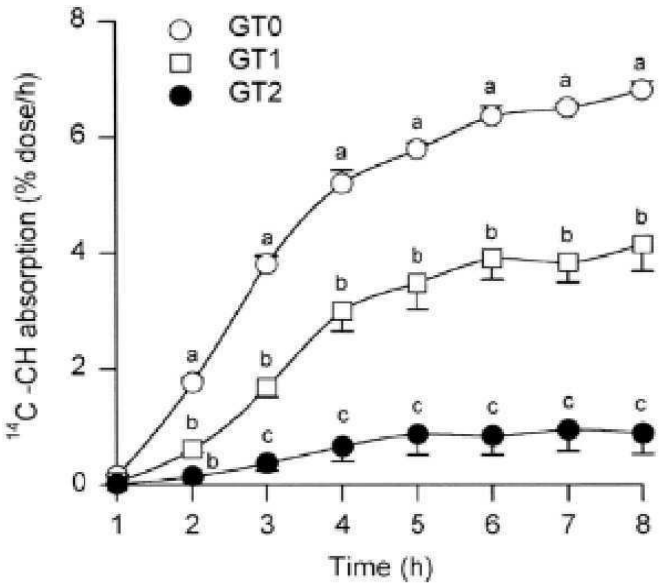
림프액 지방산 조성	대조군 (㎛ol/8h)	저농도 수수추출물 투여군 (㎛ol/8h)	저농도 수수추출물 투여군 (㎛ol/8h)
16:0	99.07	82.52	75.32
18:0	38.85	32.54	31.36
18:1	1,427.30	1,282.40	1,122.40
18:2	85.60	70.12	69.36
20:4	50.71	41.71	38.90
22:6	7.39	5.52	5.06
총량	1,708.90	1,514.80	1,342.40

[0048] 실시예 6 : 수수추출물이 인지질(phospholipid) 분비율에 미치는 영향

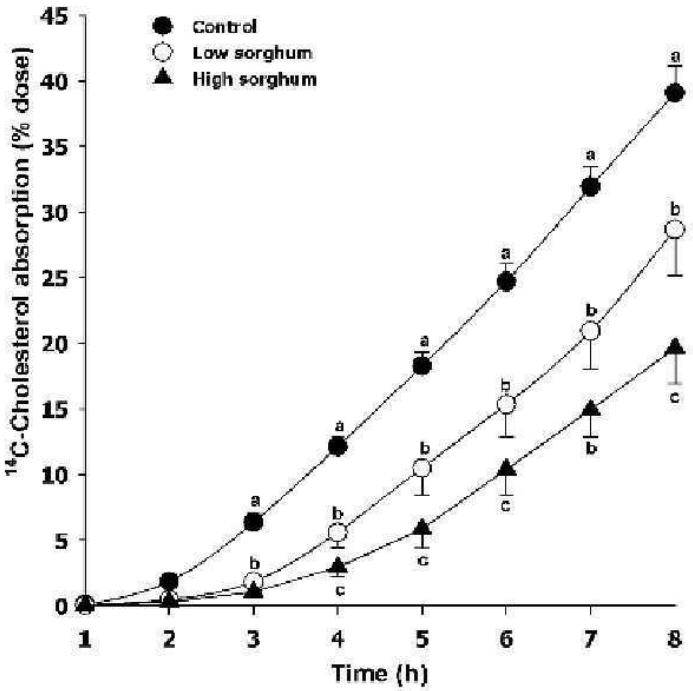
[0049] 인지질은 지방유화액에 포함되지 않았다. 즉, 이 인지질 분석 결과는 내인성 지방(endogenous lipid)에 관한 것이다. 수수추출물 투여가 흡수과정 중에 식이성 지방이 아닌 내인성 지방의 대사에 어떤 영향을 미치는지를 확인 할 수 있는 결과이다(도 5). 대조군과 비교해서 수수추출물이 많고 적음에 상관없이 8시간 동안 내인성 인지질의 분비율에는 영향을 미치지 않았다.

도면

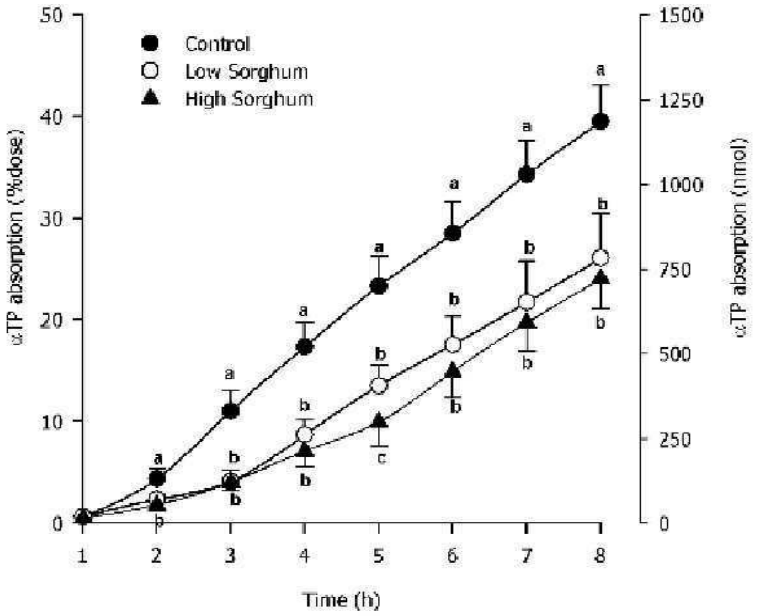
도면1



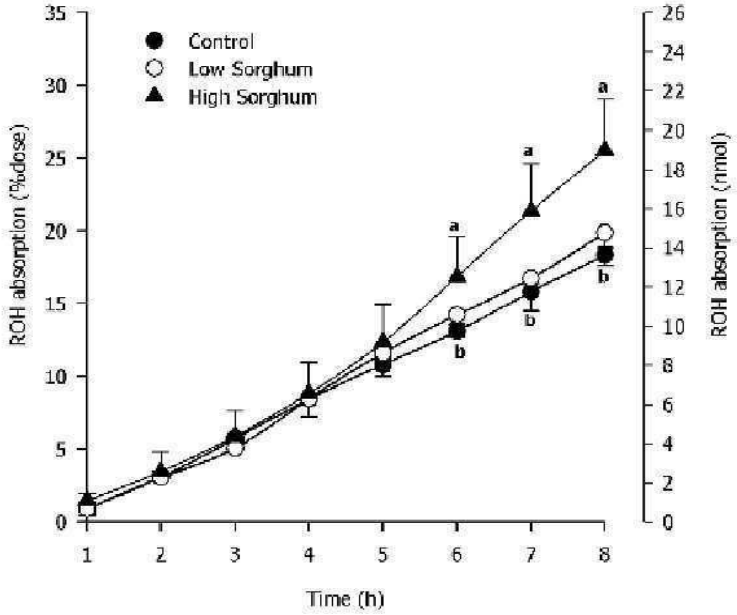
도면2



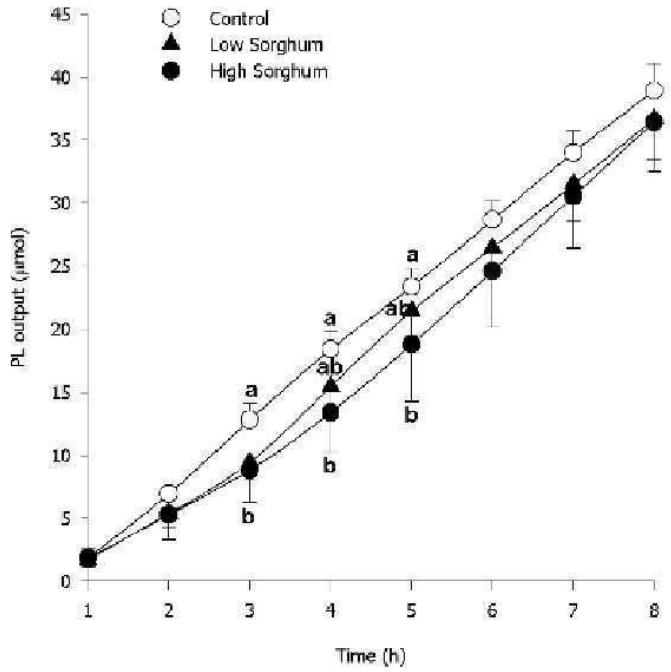
도면3


Control
Low Sorghum
High Sorghum
αTP absorption (%dose)
αTP absorption (nmol)
Time (h)

도면4


Control
Low Sorghum
High Sorghum
ROH absorption (%dose)
ROH absorption (nmol)
Time (h)

도면5


Control
Low Sorghum
High Sorghum
PL output (μmol)
Time (h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
1
2
3
4
5
6
7
8
a
ab
b
a
ab
b
a
ab
b