



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0047071
(43) 공개일자 2008년05월28일

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)

A23L 2/04 (2006.01) A23L 2/38 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0116954

(22) 출원일자 2006년11월24일

심사청구일자 2006년11월24일

(71) 출원인

이인선

대구광역시 수성구 황금동 368 캐슬골드파크
1416-1803

계명대학교 산학협력단

대구 달서구 신당동 1000번지

(72) 발명자

이인선

대구광역시 수성구 황금동 368 캐슬골드파크
1416-1803

유미희

대구 달서구 용산동 평화타운 301동 701호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인명문

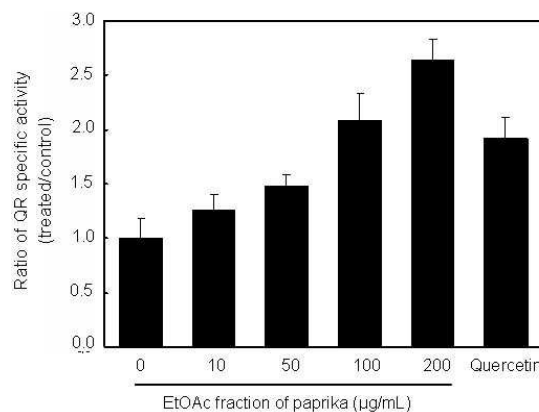
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 퀘논 리덕타아제의 활성을 유도하는 파프리카 추출물 및 이를 함유하는 건강기능식품

(57) 요약

본 발명은 파프리카 추출물을 퀘논 리덕타아제의 활성 유도물질로 사용하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 파프리카 추출물이 퀘논 리덕타아제의 활성을 유도함을 확인하고, 특히 파프리카 메탄올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물의 경우 가장 우수하게 퀘논 리덕타아제 활성을 유도함을 확인하며, 이를 음료 등 건강식품에 함께 배합함으로써 폭넓은 계층에 걸쳐서 간편하게 섭취가 가능하여 장기적으로는 암예방에 기여할 수 있는 건강기능성 식품을 제공할 수 있는 발명이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

임효권

대구 수성구 수성동1가 536-10번지 한백빌라 106동 102호

이승욱

대구 서구 내당1동 황제맨션 106동 1101호

황보미향

대구 동구 검사동 907-7

이지원

대구 달서구 본동 610-5번지

이효정

대구 북구 태전동 에덴 APT 103동 1302호

특허청구의 범위

청구항 1

퀴논 리덕타아제의 활성 유도물질을 포함하는 파프리카 추출물.

청구항 2

퀴논 리덕타아제의 활성 유도물질을 포함하는 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물.

청구항 3

퀴논 리덕타아제에 대한 활성 유도물질을 포함하는 파프리카 추출물을 전체 조성 중 적어도 0.1중량% 함유하는 파프리카 추출물을 함유하는 건강기능식품.

청구항 4

퀴논 리덕타아제에 대한 활성 유도물질을 포함하는 파프리카 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 전체 조성 중 적어도 0.1중량% 함유하는 파프리카 추출물을 함유하는 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <3> 본 발명은 파프리카 추출물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 파프리카 추출물이 퀸 리덕타아제의 활성을 유도하여 암예방 효과를 가짐을 확인하고, 이를 음료 등의 음식물에 함께 배합함으로써 장기적으로는 암예방 효과를 갖는 파프리카 추출물이 함유된 건강기능식품에 관한 것이다.
- <4> 최근 식품 및 천연물을 이용한 생리활성 물질의 검색 및 그 작용기작에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 암을 예방하거나 치료할 수 있는 화학적 암예방법에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있다.
- <5> 우리나라에서는 200여종 이상의 한방 생약제가 암 환자에게 처방되고 있음이 통계적으로 밝혀졌고, 수종의 한약재와 향신료, 채소류, 과일류 등에서 항암 작용이 보고되고 있다.
- <6> 많은 과학자들이 일부 한국에 자생하는 약용식물 및 식용식물 추출물의 항암 효과에 관한 연구를 보고한 바 있으며, 중국이나 일본에서도 각 나라의 자생 식용식물의 항암성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- <7> 한편, 여러 가지 종양의 초기 발단은 발암물질, 변이원성 물질, 활성산소종에 의하여 DNA에 손상을 주게 됨으로써 일어나는데, 포유류의 세포는 그러한 손상에 대해 보호작용을 가지는 복합적이고 정교한 작용기작을 가지고 있다. 즉, 전자 친화성을 가진 발암물질들이 무독화 효소들에 의해 불활성되어 체외로 배출되면 암으로 진행이 되지 않지만, DNA와 부가체(adduct)를 형성하여 돌연변이 또는 전이(trasformation) 과정을 거치면 암으로 진행되게 된다.
- <8> 그 항암 기작 중 대표적인 것으로 체내 독성물질이나 발암물질을 무독화 시키는 NADP(H):퀴논 리덕타아제(quinone reductase, QR)와 글루타티온 설파-트랜스퍼라아제(glutathione sulfur transferase, GST) 및 UDP-글루쿠로노실 트랜스퍼라아제(UDP-glucuronosyltransferase) 등의 제 2상(phase II) 효소계의 활성유도와 제 1상(phase I) 효소계인 사이토크롬(cytochrome) P450 효소활성 억제, glutathion 생성, transformed cell에서 그 함량이 증가되는 polyamine 생성억제 등을 들 수 있다.
- <9> 특히 상기한 무독화 효소들 중에서도 제 2 상 무독화 효소는 각종 암세포에 대한 특이적인 세포독성을 나타내어 항암기능을 갖는 등의 발암물질, 변이원성 물질, 활성산소종에 의한 DNA의 손상으로부터의 보호작용을 갖는다고 알려져 있다.
- <10> 제 2상 무독화 효소 중에서, 퀸 리덕타아제는 간세포에서 주로 생성되는 제 2 상 효소계의 한 종류로, 퀸을 환원시켜 무독하게 만들고 세포내에 유도되어 여러 돌연변이 물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화를 막아주

고 발암물질을 무독하게 하는 역할을 한다. 좀더 구체적으로 퀴논 리덕타아제는 돌연변이 또는 발암물질 등에 의한 DNA와의 상호작용을 차단하는 효소이며, NADP(H)를 이용하여 퀴논류의 환원을 촉매하는 플라보프로테인(flavoprotein)으로, 분자량은 약 54,000Da이고 동일한 구조가 2개 결합된 호모다imer(homodimer)로, 그 각각은 273개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 활성부위에는 플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드(flavin adenine dinucleotide, FAD)를 함유하고 있으며, 일명 메나디온 리덕타아제(menadione reductase), 비타민 K 리덕타아제(vitamin K reductase), DT-다이아포라아제(DT-diaphorase) 등으로 불린다.

- <11> 이러한 퀴논 리덕타아제는 여러 가지 특징을 가지고 있는데, 첫째로는, NADP(H)를 전자공여체로 이용하고, 둘째로는 2개의 전자를 이동시켜 세미퀴논(semiquinone)을 형성하지 않으며, 셋째로는 디큐마롤(dicoumarol)과 같은 항혈액응고제에 의해 강한 저해를 받으며, 넷째 많은 세포와 조직에서 여러 가지 외부물질들에 의해 유도된다는 것이다. 특히, 이러한 퀴논 리덕타아제는 퀴논류 자체에 대한 보호효과가 있음은 물론 다른 암예방 효소계와 공통적으로 유도되며 항암작용이 있는 많은 화합물에 의해 유도되는 특징으로 인하여 제2상제 무독화 효소를 암예방 물질 탐색의 지표가 되는 대표적인 효소로 선정될 수 있다.
- <12> 이와 같은 퀴논 리덕타아제의 활성을 유도하는 성분으로는 방향족 탄화수소류(aromatic hydrocarbons), 플라보노이드류(flavonoids), 아조계 염료(azo dyes), 다이페놀류(diphenols), 티오카바메이트류(thiocarbamates), 이소시아네이트류(isocyanates), 1,2-디티올-3-티온류(1,2-dithiol-3-thiones) 계통의 화합물 등이 밝혀져 있다.
- <13> 그러나 우리나라를 비롯한 동북아시아 지역에서는 퀴논 리덕타아제의 활성을 유도하는 물질에 대해서는 주로 약용식물에 국한되어 연구가 되고 있는 경향이며, 각국에 자생하는 산채류, 채소류 및 과일류에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 거의 없는 실정이다.
- <14> 본 발명자들은 이러한 추세에 발맞추어 연구 노력한 결과 파프리카 추출물이 퀴논 리덕타아제의 활성을 유도함을 확인하였다.
- <15> 파프리카는 가지과(*Solanaceae*), 고추속(*Capsicum*), 고추종(*annuum*)에 속하는 한해살이 식물로 6개의 아종이 있으며, 파프리카란 말은 어원이 희랍어로, 현재 유럽에서는 모든 고추를 통칭하고 있다. 파프리카는 캡산틴(capsanthin), β -크립토크산틴(β -cryptoxanthin), 제아크산틴(zeaxanthin) 등의 카로티노이드계 색소를 함유하고 있으며, 비타민 A, B1 및 C가 풍부한 알칼리성 강장식품으로 알려져 있다.
- <16> 현재까지 파프리카는 항산화 작용을 나타내는 여러 가지 성분들의 분리에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 화학적인 암예방 활성에 대한 연구가 보고되어 있으나, 대표적인 암예방 효소로 알려진 퀴논 리덕타아제 활성을 유도하여 암 예방 효과를 갖는 것에 대한 연구는 이루어지지 않고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <17> 따라서 본 발명자들은 파프리카 추출물이 퀴논 리덕타아제의 활성을 유도하여 암 예방효과를 가짐을 확인하고 이를 음식물에 적용함으로써 본 발명을 완성하였다.
- <18> 본 발명의 목적은 퀴논 리덕타아제의 활성을 유도하는 파프리카 추출물을 제공하는 데 있다.
- <19> 본 발명의 목적은 퀴논 리덕타아제의 활성을 유도하는 파프리카 추출물의 특정 용매로부터 얻어진 분획물을 제공하는 데 있다.
- <20> 또한 본 발명의 목적은 퀴논 리덕타아제의 활성을 유도하는 파프리카 추출물을 함유함으로써, 간편하고 용이하게 암예방 효과를 발휘할 수 있는 건강기능식품을 제공하는 데도 있다.
- <21> 또한 본 발명의 목적은 퀴논 리덕타아제의 활성을 유도하는 파프리카 추출물의 특정 용매로부터 얻어진 분획물을 함유함으로써, 간편하고 용이하게 암예방 효과를 발휘할 수 있는 건강기능식품을 제공하는 데도 있다.
- <22> 이와 같은 목적은, 퀴논 리덕타아제의 활성 유도물질을 포함하는 파프리카 추출물로부터 달성될 수 있다.
- <23> 또한 본 발명의 목적은, 퀴논 리덕타아제의 활성 유도물질을 포함하는 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물로부터 달성될 수 있다.
- <24> 또한 본 발명의 목적은, 퀴논 리덕타아제의 활성 유도물질을 포함하는 파프리카 추출물을 전체 조성 중 적어도 0.1중량% 함유하는 파프리카 추출물을 함유하는 건강기능식품으로부터 달성될 수 있다.
- <25> 또한 본 발명의 목적은, 퀴논 리덕타아제의 활성 유도물질을 포함하는 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획

물을 전체 조성 중 적어도 0.1중량% 함유하는 파프리카 추출물을 함유하는 건강기능식품으로부터도 달성될 수 있다.

발명의 구성 및 작용

- <26> 이와 같은 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- <27> 본 발명은 파프리카 추출물을 퀴논 리덕타아제의 활성 유도물질로 사용하여 암예방 효과를 갖도록 한 파프리카 추출물의 용도에 관한 것이다.
- <28> 일반적으로 파프리카 추출물을 얻는 방법으로는 메탄올 등을 이용한 용매추출이나 주정을 이용한 주정추출, 물을 이용한 열수추출 등의 방법이 있는데, 본 발명에서는 메탄올을 이용한 용매추출 방법을 사용한 것이다.
- <29> 구체적으로, 시료인 파프리카를 구입하여 깨끗이 수세하여 씨와 꼭지를 제거한 후 5 내지 10배 용량의 80 내지 100(w/v)%의 메탄올과 혼합하여 24시간 동안 정치 추출한다. 이를 2 내지 3회 반복 추출한다.
- <30> 그 다음, 추출액을 여과지(Whatman No. 1, Maidstone, England)를 사용하여 2 내지 3회 여과하고 회전감압 농축기(R-3000, Buchi, Flawil, Switzerland)로 농축하여 동결건조한 후 분말화하여 실험의 시료로 사용하였다.
- <31> 그리고 메탄올 추출물을 물에 녹인 후 극성이 서로 다른 용매(n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, water)를 이용하여 순차 분획 후 각각 농축하고 동결건조함으로써 각 용매에 대한 분획물을 얻었다.
- <32> 한편, 퀴논 리덕타아제의 측정을 보다 신속간단하고 정확하게 하기 위해 여러 종류의 동물세포를 이용할 수 있으며, 본 발명에서는 생쥐의 간세포주(Hepa 1c17 murine hepatoma cell line, 한국 세포주 은행으로부터 분양 받음)를 도입하였다.
- <33> 이와 같은 방법으로 얻어진 파프리카 추출물에 대하여 퀴논 리덕타아제 활성 유도 효과를 측정한 결과, 암예방 효과가 상당히 우수함을 확인하고, 이를 건강기능식품 제조시에 배합함으로써 간편하고 용이하게 섭취할 수 있어서 지속적인 섭취효과를 기대할 수 있다.
- <34> 파프리카 추출물을 건강기능성 식품에 적용하는 경우에는 그 조성물 중 파프리카 추출물을 0.1중량% 이상이면 그 효과를 발현할 수 있으며, 완성되는 기능성식품이 색이나 맛 등을 고려하여 그 첨가량의 상한을 고려할 수 있다.
- <35> 이하, 본 발명을 실시예에 의거 더욱 상세하게 설명하겠는바, 본 발명이 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <36> **비교실험예: 천연물 자원으로부터 퀴논 리덕타아제 유도물질 탐색**
- <37> 퀴논 리덕타아제의 유도 활성이 가장 강한 유도물질을 선정하기 위해서 퀴논 리덕타아제의 활성유도물질로 알려진 식물의 메탄올 추출물을 대상으로 Hepa 1c1c7 cell culture system에서 퀴논 리덕타아제 활성에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 다음 표 1에 나타내었다.

표 1

Korean name	농도($\mu\text{g/mL}$)	퀴논 리덕타아제 유도활성(-배)
비름나물	100	1.20 $\pm$ 0.09
	250	1.83 $\pm$ 0.02
	500	2.19 $\pm$ 0.16
인동초잎	100	1.42 $\pm$ 0.09
	250	2.02 $\pm$ 0.13
	500	2.32 $\pm$ 0.11
아보카도	100	1.19 $\pm$ 0.05
	250	1.74 $\pm$ 0.05
	500	2.16 $\pm$ 0.18
쇠무릅씨	100	1.55 $\pm$ 0.18
	250	1.70 $\pm$ 0.08
	500	2.06 $\pm$ 0.15

뽕잎	100	1.33 ± 0.03
	250	1.62 ± 0.06
	500	1.91 ± 0.04
황칠나무	100	1.68 ± 0.05
	250	1.86 ± 0.06
	500	1.93 ± 0.06
솔잎	100	1.12 ± 0.07
	250	1.15 ± 0.10
	500	1.23 ± 0.07
몰로키아	100	1.35 ± 0.03
	250	1.77 ± 0.05
	500	2.25 ± 0.17
파프리카	100	1.65 ± 0.03
	250	2.31 ± 0.13
	500	2.55 ± 0.13
커리플라워	100	1.39 ± 0.02
	250	1.61 ± 0.13
	500	1.86 ± 0.06
적채	100	1.21 ± 0.04
	250	1.30 ± 0.02
	500	1.60 ± 0.07
복령	100	1.35 ± 0.07
	250	1.42 ± 0.04
	500	1.57 ± 0.02

<39> 상기 표 1에 나타난 바와 같이 파프리카의 메탄을 추출물의 경우 다른 식물류에 비하여 우수한 퀴논 리덕타아제 유도활성을 나타내었다.

<40> **참고예: 동물세포주 배양**

<41> 본 실험에 사용한 세포주로는 마우스 유래의 간암 세포주인 Hepa 1clc7 (murine hepatoma cell line), BP^fcl (Ah-receptor-defective mutant of hepa 1clc7 cell line)으로서, 이는 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받았으며, 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37℃ 배양기에서 1주일에 2-3회 계대 배양하였다.

<42> **실시예 : 시료의 제조 및 분획**

<43> 파프리카는 대형 마트에서 구입한 후 깨끗이 수세하여 씨와 꼭지를 제거한 후 10배 용량의 80% 메탄올과 혼합하여 24시간 동안 정치 추출하고, 이를 총 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 1, Maidstone, England)를 사용하여 2회 여과하고 회전감압 농축기(R-3000, Buchi, Flawil, Switzerland)로 농축하여 동결건조를 한 후 분말화하여 본 실험의 시료로 사용하였다.

<44> 메탄올 추출물을 물에 녹인 후 극성이 서로 다른 용매(n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, water)를 이용하여 순차 분획 후 각각 농축하고 동결건조 함으로써 각 용매에 대한 분획물을 얻었다.

<45> 구체적으로, 파프리카의 메탄올 추출물 5 g을 n-hexane, 디클로로메탄, 에틸 아세테이트, n-부탄올 및 수층의 용매별로 분획하여 다음 표 2에 나타난 것과 같이, 헥산층은 0.0455 g (0.91%), CH₂Cl₂ 층은 0.2252 g (4.5%), EtOAc 층은 0.0165 g (0.33%), BuOH 층은 0.3297 (9.61%)을 얻었고, 나머지 수층은 3.5210 g (70.42%)의 분획물을 얻었다.

표 2

<46>

각 분획 중량 (백분율(중량%))				
헥산	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	BuOH	수층
0.0455 (0.91)	0.2252 (4.50)	0.0165 (0.33)	0.3297 (9.61)	3.5210 (70.42)

<47>

실험예

<48>

(1) 세포내 퀸 리덕타아제 활성 유도효과 측정

<49>

세포내 퀸 리덕타아제 활성의 유도 효과 측정은 Benson 등(Benson, A., Hunkeler, M. J., Talay, P. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants. Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 5216-5220 (1980))의 방법에 따라 측정하였다.

<50>

즉, 배양한 생쥐의 간세포를 0.4% 트립판 블루(trypsin blue) 염색법으로 세포수를 측정한 후 1×10^4 cells/well의 농도로 96-well 마이크로타이타 플레이트(microtiter plate)의 각 웰(well)에 200 μ L씩 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 MEM배지 200 μ L에 녹인 농도별 시료를 각 웰(well)에 첨가한다. 시료가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 제거하고 pH 7.4의 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척한 다음, 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 용해시켰다. 세포를 용해시킨 후 각 웰(well)에 50 μ L의 2% 트리톤 X-100(triton X-100)을 첨가한 후 마이크로플레이트 셰이커(microplate shaker)를 이용하여 300 rpm에서 10분간 흔들어 준다. 그리고 나서 다음과 같은 조성을 갖는 반응액 200 μ L를 각 웰(well)에 첨가하고 5분간 반응시켰다;

<51>

반응액 조성: 증류수를 첨가한 최종 150 mL에 대해 7.5 mL의 0.5 M 트리스-HCl(pH 7.4), 100 mg의 보바인 시럽 알부민(BSA), 1.0 mL의 1.5% 트윈-20(tween-20), 0.1 mL의 7.5 mM FAD(플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드), 1.0 mL의 150 mM 글루코오스-6-포스페이트(glucose-6-phosphate), 90 μ L의 50 mM NADP(니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오타이드), 300 units의 이스트 글루코오스-6-포스페이트 디하이드로게나아제(yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase), 45 mg의 MTT(3-(4,5-디메틸-티아조-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨브로마이드) 및 150 μ L의 50 mM 메나디온(menadione) 함유.

<52>

반응 후, 0.5% DMSO에 녹인 0.3 mM 디쿠마롤(dicumarol)과 5 mM 포타슘 포스페이트(potassium phosphate)가 함유된 용액 50 μ L를 첨가하여 반응을 중지시키며, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<53>

퀸 리덕타아제의 비활성(specific activity)은 환원된 MTT와 크리스탈 바이올렛(crystal violet)에 의한 흡광도로 산정하고, 퀸 리덕타아제의 유도활성은 시료를 처리하지 않은 대조군의 퀸 리덕타아제의 활성에 대한 시료를 처리한 퀸 리덕타아제의 활성의 비로 나타낸다. 퀸 리덕타아제 비활성도를 다음 수학적 식을 사용하여 계산하였다.

수학적 식 1

<54>

퀸 리덕타아제 비활성도(nmol/min/mg) = [MTT의 흡광도 변화/min $\times$ 단백질 3,345 nmoles/mg] / 크리스탈 바이올렛의 흡광도

<55>

상기 식에서, 단백질 3,345 nmoles/mg은 크리스탈 바이올렛과 MTT의 흡광계수로부터 계산된 비례상수이다.

<56>

(2) 크리스탈 바이올렛 염색

<57>

단백질 함량 및 살아있는 세포에 의한 퀸 리덕타아제의 유도활성만을 측정하기 위한 크리스탈 바이올렛 염색은 Drysdale 등(Drysdale BE, Zacharchuk CM, Okajima M, Shin HS. In Methods in Enzymology (Di Sabato, G., and eberse, T., Eds.). Academic press: Orlando. FL. USA 132: 549-555 (1986))의 방법에 준하여 실시하였다.

<58>

퀸 리덕타아제 활성 측정을 위한 상기 (1)과 동일하게 96-웰 플레이트에 생쥐의 간세포를 접종하여 24시간 배양한 후 시료를 처리하고 48시간 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고, PBS로 3회 세척한 다음 2% 에탄올에 녹인

0.2% (w/v) 크리스탈 바이올렛(crystal violet)에 10분간 담근 후 2분간 흐르는 물에 씻는다. 여기에 50% 에탄올에 녹인 0.5% (w/v)소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS)를 200 μ L씩 각 웰(well)에 첨가하고 37℃의 CO₂ 인큐베이터에서 1시간 반응시킨 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<59> (3) 총 폴리페놀 함량

<60> 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법(Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phospho-molybdic compounds as color reagents. J. Biol. Chem. 12: 239-249 (1912))을 응용하여 측정하였다. 즉 메탄올 추출물 및 분획물 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석한 Folin 시약 2 mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 10% Na₂CO₃ 2 mL을 넣고 1시간 반응시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron, Italy)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이 때 탄닌산(tannic acid)을 이용한 표준곡선은 탄닌산의 최종농도가 5, 25, 50 μ g/mL가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<61> (4) 총 플라보노이드 함량

<62> 시료중의 총 플라보노이드 함량은 Moreno(Moreno MIN, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71: 109-114 (2000)) 등의 방법에 의해 측정하였다. 각 분획물 및 추출물 0.1 mL와 80% 에탄올 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% 알루미늄 나이트레이트(aluminium nitrate)와 1 M 포타슘 아세테이트(potassium acetate) 0.1 mL 그리고 80% 에탄올 4.3 mL을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 흡광도를 표준물질로 사용한 퀘세틴(querceetin) 검량선과 비교하여 총 플라보노이드의 함량을 구하였다. 퀘세틴을 이용한 표준곡선은 퀘세틴의 최종농도가 5, 25, 50 μ g/mL가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 415 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

<63> 상기 모든 실험 측정치는 3번 반복 실시하여 그 평균값으로 나타내었으며, 실험결과는 SAS 프로그램을 이용하여 분산 분석한 후 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 P<0.05 수준에서 시료간의 유의차를 검정하였다.

<64> 상기 (1) 내지 (3)의 측정 결과를 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

<65> (1) 파프리카 메탄올 추출물 및 분획물의 퀴논 리덕타아제 유도 활성

<66> 마우스 유래 간암세포주인 Hepa 1c1c7 세포주에 대한 파프리카 메탄올 추출물 및 분획물의 퀴논 리덕타아제 유도활성을 비교하기 위해 CD(the concentration required to double the specific activity of quinone reductase), IC₅₀ 그리고 CI(the ratio between IC₅₀ and CD)값을 측정한 결과는 다음 표 3과 같다.

표 3

시료	CD ^a (mg/mL)	IC ₅₀ ^b (mg/mL)	CI ^c
MeOH 추출물	3.443	3.915	1.137
헥산 분획	0.047	0.608	12.936
CH ₂ Cl ₂ 분획	0.484	0.851	1.758
EtOAc 분획	0.072	1.031	14.319
BuOH 분획	0.429	1.396	3.254
수층	2.767	3.423	1.237
^a Mean value of the concentration required to double the specific activity of quinons reductase. ^b Mean value of the half-maximal inhibitory concentration of cell viability. ^c The ratio between IC ₅₀ and CD.			

<68> 상기 표 3의 결과와 같이 각 분획물들의 CD값을 비교해 본 결과, 헥산층과 에틸 아세테이트(EtOAc)층이 각각 47, 72 μ g/mL로, 가장 낮은 농도에서 퀴논 리덕타아제 활성을 2배로 증가시키는 것을 알 수 있었다.

<69> 또한, 세포독성을 나타내는 IC₅₀값은 메탄올 추출물과 수층에서 높게 나타나 독성이 낮음을 확인하였고, 결과적

으로 에틸 아세테이트층의 CI값이 가장 높게 나타나 비교적 독성이 낮으면서 퀴논 리덕타아제 활성을 높여주는 물질은 파프리카의 에틸 아세테이트층에 존재하는 것으로 생각된다.

<70> (2) 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량

<71> 폴리페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고 산화-환원반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 총치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다.

<72> 파프리카의 메탄올 추출물과 각 분획물에 존재하는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 탄닌산, 퀴세틴을 기준물질로 하여 측정하여 그 결과를 다음 표 4에 나타내었다.

표 4

시료	총 폴리페놀 함량 ^a (mg/g)	총 플라보노이드 함량 ^b (mg/g)
메탄올 추출물	18.22 ± 2.04	10.02 ± 0.56
헥산 분획	6.06 ± 1.27	9.35 ± 2.52
CH ₂ Cl ₂ 분획	12.92 ± 0.95	16.54 ± 0.04
EtOAc 분획	44.90 ± 3.19	53.71 ± 2.53
BuOH 분획	28.22 ± 3.05	50.23 ± 3.39
수층	19.58 ± 0.87	9.90 ± 1.56

<74> 상기 표 4의 기재에 있어서, 총 폴리페놀 함량은 탄닌산 당량으로 표시된 것이며, 총 플라보노이드 함량은 퀴세틴 당량으로 표시된 것이며, 각 값은 3번 반복실험한 평균± 표준편차로 표현된 것이다.

<75> 상기 표 4의 결과로부터, 파프리카의 메탄올 추출물과 분획물들 중 에틸 아세테이트 분획물의 총 폴리페놀 함량은 44.9 mg/g, 총 플라보노이드 함량은 53.71 mg/g으로 가장 높게 나타나 퀴논 리덕타아제 유도활성과 일치하는 결과를 보였다.

<76> 식용식물의 퀴논 리덕타아제 유도활성에 대해서는 최근 수년간 연구가 활성화되면서 설포라판(sulforaphane), 브라시닌(brassinin) 및 설포라메이트(sulforamate) 등의 주요 성분들이 분리 확인되었는데, 미국에서는 주로 채소류를 이용하여 연구를 진행하여 몇 가지 새로운 플라보노이드 화합물을 분리하였으며, 80종 이상의 천연 또는 합성 플라보노이드 화합물에 대한 실험 결과 플라본(flavone)의 단순한 유도체인 4'-브로모플라본이 강력한 퀴논 리덕타아제 유도물질로 밝혀지기도 하였다. 따라서 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높다는 것은 퀴논 리덕타아제 유도 활성이 우수함을 나타내는 바, 특히 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물이 우수한 퀴논 리덕타아제 유도활성 물질로 유용함을 알 수 있다.

<77> 한편, 국내산 식용식물중의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 분석한 결과를 살펴보면 국내 시판되는 일부 다류의 경우 홍차, 인삼차, 녹차, 한차의 폴리페놀 함량은 각각 101.51, 28.30, 94.90, 95.81 mg/g이고, 플라보노이드 함량은 각각 16.75, 3.29, 6.72, 6.06 mg/g이며(Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. The antioxidant activities of the some commercial teas. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 723-727 (2003)), 홍차씨, 순 및 꽃의 폴리페놀 함량은 각각 12.34, 5.10, 8.05%(Kim HJ, Jun BS, Kim SK, Cha JY, Cho YS. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 1127-1132 (2000)), 한방아로마 식물인 *Salvia officinalis*, *Matricaria recutita*, *Potentilla fruticosa*의 폴리페놀 함량은 각각 22.6, 7.5, 37.9 mg/g이며, 플라보노이드 함량은 각각 3.5, 7.1, 6.1 mg/g으로 보고되었다(Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chem. 85: 231-237 (2004)). 그리고 아르헨티나 여러 지역 프로폴리스의 플라보노이드 함량은 13.3~42.06 mg/g으로 보고되었다(Moreno MIN, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol. 71: 109-114 (2000)).

<79> 이들 결과들과 비교해 볼 때 파프리카의 에틸 아세테이트 분획물은 특히 많은 양의 플라보노이드를 함유하고 있

는 것으로 나타났다.

<80>

<81> (3) 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물의 퀸 리덕타아제-단기능성 유도물질(quinone reductase-monofunctional inducer)로의 활성화

<82> 얻어진 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물에 대하여 퀸 리덕타아제 유도 활성을 구체 측정하여 그 결과를 도 1로 나타내었다. 퀸 리덕타아제 유도 활성의 측정은 상기한 것과 같다.

<83> 도 1과 같이 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물의 유도 활성은 농도 의존적으로 그 활성이 증가하였으며, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 퀸 리덕타아제 활성은 약 3.3배로 가장 높게 나타났다. 이는 우수한 퀸 리덕타아제 유도물질로 알려진 β -나프토플라본(β -naphthoflavone, β -NF)과도 비슷한 활성을 가짐을 알 수 있었다.

<84> 한편, 여러 항암성분들은 제 2상 효소계만을 활성화시키는 단기능성 유도물질(monofunctional inducer)과 제 1상 효소계를 함께 활성화시키는 복기능성 유도물질(bifunctional inducer)로 나뉘어 지는데, 복기능성 유도물질은 세포질에 존재하는 Ah 수용체 단백질에 결합하여 사이토크롬 P 450을 포함한 제 1상 효소계의 유전자에 작용하여 효소합성을 촉진하며, 유도된 1상 효소계에 의해서 대사된 화합물은 단기능성 유도물질과 유사한 기작으로 제 2상 효소계를 활성화시키는 것으로 추정하고 있다. 단기능성 유도물질은 Ah 수용체와는 독립적으로 제 2상 효소계만을 선택적으로 유도하는데, 프로카시노겐(procarcinogen)의 bioactivation과는 관련이 없으므로 복기능성 유도물질 보다는 항암활성이 더 우수한 것으로 알려져 있다.

<85> 이에 제 2상 효소계만을 활성화시키는 단기능성 유도물질과 제 1상 효소계를 함께 활성화시키는 복기능성 유도물질을 구별하기 위해 제 1상 효소계의 활성 없이 제 2상 효소계만을 활성화시키는 Hepal1c7 세포의 변이주인 BP^rc1 세포주를 이용하여 파프리카 추출물을 에틸 아세테이트 분획물의 퀸 리덕타아제 유도활성을 살펴본 결과는 도 2와 같다. BP^rc1 세포주에서는 Hepal1c7의 세포주에서와 같이 농도 의존적으로 높은 활성을 보였다. 또한 단기능성 유도물질로 알려진 퀸세틴이 20 μM 에서 약 2배의 활성을 보인 반면, 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물은 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 그 활성이 2.5배 이상 증가하는 것을 보여 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물의 항암성분은 단기능성 유도물질인 것으로 판단된다.

<86> 이상의 결과를 요약하면, 제 2 상 효소계는 자연계에 존재하는 다양한 화학물질과 천연소재들에 의해 유도되며, 이들의 유도는 화학적 발암물질과 그 밖의 여러 가지 독성물질들로부터 생체를 보호하는데 중요한 역할을 한다. 본 발명에서는 파프리카의 메탄올 추출물을 제조하고, 이를 각 용매별로 분획하여 Hepal1c7 세포주를 이용하여 대표적인 암예방 효소인 퀸 리덕타아제의 유도 활성을 조사하였으며, 그 중 퀸 리덕타아제 유도활성이 가장 높았던 에틸 아세테이트 분획물의 경우 10-500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리했을 때 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 퀸 리덕타아제의 활성이 약 3.3배로 가장 높게 나타났으며, 파프리카의 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 역시 에틸 아세테이트 분획물에서 가장 높게 나타났다. 또한 BP^rc1 세포주에서도 농도 의존적으로 높은 퀸 리덕타아제 유도활성을 보여 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물은 단기능성 유도물질인 것으로 판단된다.

<87> **실시예 2:** 기능성 음료의 제조

<88> 상기 실시예 1로부터 얻어진 파프리카 추출물 분말 0.01중량%와 식용색소 0.05중량%, 오렌지 에센스 0.05중량%, 과다 7.0중량%, 구연산 0.1중량%, 비타민 C 0.05중량%를 포함하는 일반 기능성 음료 베이스를 첨가한 조성물을 제조한 다음, 정제수를 가하여 음료를 제조하였다.

<89> **실시예 3:** 건강 식품의 제조

<90> 상기 실시예 1의 파프리카 추출물 1,000mg, 적량의 비타민 혼합물(비타민 A 아세테이트 70 μg , 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μg , 비타민 C 10mg), 비오틴 10 μg , 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μg , 판토텐산 칼슘 0.5mg, 적량의 무기질 혼합물(황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg)을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용한다.

<91> **실시예 4:** 기능성 음료의 제조

<92> 상기 실시예 1로부터 얻어진 파프리카 추출물 분말의 에틸 아세테이트 분획물 0.01중량%와 식용색소 0.05중량%, 오렌지 에센스 0.05중량%, 과다 7.0중량%, 구연산 0.1중량%, 비타민 C 0.05중량%를 포함하는 일반 기능성 음료

베이스를 첨가한 조성물을 제조한 다음, 정제수를 가하여 음료를 제조하였다.

<93> 실시예 5: 건강 식품의 제조

<94> 상기 실시예 1로부터 얻어진 파프리카 추출물 분말의 에틸 아세테이트 분획물 1,000mg, 적량의 비타민 혼합물 (비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg), 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 적량의 무기질 혼합물(황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3mg, 제1인산칼슘 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼슘 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg)을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용한다.

발명의 효과

<95> 이상에서 상세히 설명한 것과 같이, 본 발명은 파프리카 추출물이 퀴논 리덕타아제의 활성을 유도함을 확인하였고, 특히 파프리카 메탄올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물의 경우 가장 우수하게 퀴논 리덕타아제 활성을 유도함을 확인하였으며, 이를 음료 등 건강식품에 함께 배합함으로써 폭넓은 계층에 걸쳐서 간편하게 섭취가 가능하여 장기적으로는 암예방에 기여할 수 있는 건강기능성 식품으로 유용하다.

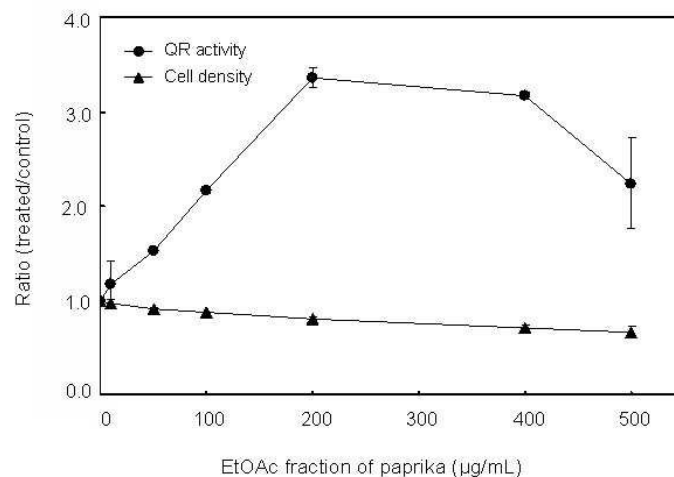
도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물의 농도에 따른 Hepalcl7 세포주 내에서의 퀴논 리덕타아제 유도활성을 나타낸 그래프로서, 각 값은 3회 반복실험하여 측정한 평균 $\pm$ 표준편차이고, 비이클 대조군에 대한 상대값으로 표현된 것이다.

<2> 도 2는 파프리카 추출물의 에틸 아세테이트 분획물의 농도에 따른 Hepalcl7 세포(BP^rc1)의 Ah 수용체 단백질의 퀴논 리덕타아제 활성을 측정한 그래프로서, 퀴논 리덕타아제의 단기능 유도물질에 대한 양성 대조군으로 20 μ M 퀴세틴과 대비한 것으로, 각 값은 3회 반복실험하여 측정한 평균 $\pm$ 표준편차이다.

도면

도면1



도면2

