



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년04월12일
 (11) 등록번호 10-1611852
 (24) 등록일자 2016년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A23L 1/30 (2006.01) B01D 11/04 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 A23L 1/3002 (2013.01)
 B01D 11/0423 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0025524
 (22) 출원일자 2015년02월24일
 심사청구일자 2015년02월24일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110067216 A*
 공연회 외 3명, '마라소스 주원료인 고추 및 산초 에탄올추출물의 항산화 및 항비만 효과', 한국식품영양과학회지 제42권제10호, 1544-1551쪽, 2013년.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 주식회사 한빛향료
 충북 음성군 대소면 대소산단로 44-56,
 강원대학교산학협력단
 강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
 (72) 발명자
 이정일
 서울특별시 성동구 왕십리로31나길 22, 1동 1101호 (하왕십리동, 한신무학아파트)
 유승권
 충청북도 진천군 이월면 성중로 427
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

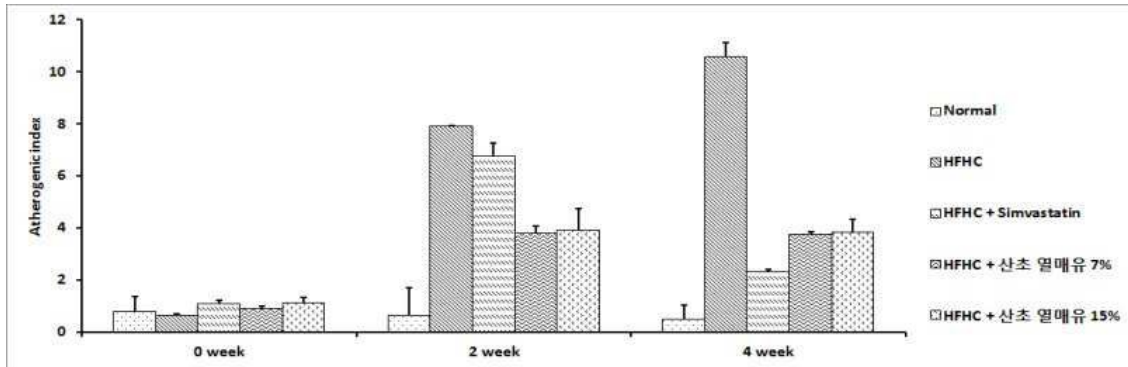
심사관 : 김현주

(54) 발명의 명칭 산초 열매유를 함유하는 동맥경화 예방 또는 개선용 식품 조성물

(57) 요약

산초 열매유를 함유하는 동맥경화 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것으로, 천연물 유래이기 때문에 부작용이 없고, 우수한 항동맥경화 효능을 나타낸다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

김기현

충청북도 진천군 광혜원면 바들말1길 10, B동 207호

최면

강원도 춘천시 동면 만천로 107, 102동 502호(한일유엔아이아파트)

강윤환

강원도 춘천시후석로186번길 9, 103동 608호(석사동, 진흥아파트)

김대중

강원도 횡성군 횡성읍 어사매로 68, 104동 903호(석미모닝파크아파트)

임재천

강원도 원주시 시청로 92, 307동 602호 (무실동, 무실주공3단지아파트)

김경곤

강원도 춘천시백령로138번길 66-3, 201호 (효자동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 312001-03-01-HD040

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치 식품개발사업

연구과제명 기존 수입의존 식물성유지 대체소재 개발

기여율 1/1

주관기관 (주)한빛향료

연구기간 2012.08.08 ~ 2015.08.07

명세서

청구범위

청구항 1

산초 열매에 지용성 용매로 헥산을 가하여 30분 동안 초음파 추출하는 단계 (a);

상기 추출 후, 5℃에서 24시간 동안 침지시키는 단계 (b); 및

상기 침지 후, 여과 및 농축하여 산초 열매유를 수득하는 단계 (c);를 포함하고,

상기 산초 열매유는 내피성 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase)의 활성을 증가시키고, 세포 간 접합분자 1(intercellular adhesion molecule(ICAM)-1) 및 혈관세포 접합분자 1(vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 동맥경화 예방 또는 개선용 식품 조성물의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 헥산은,

산초 열매의 무게 대비 2~5배 만큼 산초 열매에 첨가하는 것을 특징으로 하는 동맥경화 예방 또는 개선용 식품 조성물의 제조방법.

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 산초 열매유를 함유하는 식품 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 산초 열매유를 함유하는 동맥경화 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 현대인은 서구화된 식습관과 운동부족으로 인해 성인병의 발병이 증가하고 있으며, 그 중 동맥경화 발생 인구는 해마다 증가하고 있는 추세이다. 동맥경화는 다양한 합병증과 함께 환자 삶의 질을 크게 떨어뜨리는 문제를 유발하기 때문에, 치료 및 관리가 무척 중요한 질병이다.

- [0003] 혈관의 건강을 지키기 위해서는 혈압을 조절하고 혈관 내 이물질의 침착을 막는 것이 가장 중요하다. 혈압은 심장의 박동과 함께, 혈관 내피세포와 근육세포의 수축과 이완이 유기적으로 조절되면서 유지된다. 혈관에 압력이 가해지거나 혈류량이 증가할 때 혈관이 적절하게 이완하지 못하면, 혈압이 상승하고, 그로 인해 고혈압, 부정맥, 심장마비, 동맥경화 등이 발생한다.
- [0004] 대표적인 혈관 이완인자로는 혈관내피세포의 내피성 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)에 의해 발생하는 일산화질소(nitric oxide, NO)가 잘 알려져 있으며, 이는 항 죽상경화(anti-atherogenic) 효과를 유도하는 것으로도 알려져 있다.
- [0005] 내피세포에서 생산된 일산화질소는 혈관평활근으로 이동하여 세포 내 구아닐산고리화 효소(guanylate cyclase, GC)와 결합하고, 활성화된 구아닐산고리화효소는 구아노신 삼인산(guanosine triphosphate, GTP)을 고리형 구아노신 일인산(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)으로 전환하여, 'cGMP-dependent protein kinase G (PKG)'를 활성화하고, 'Ca²⁺-activated K⁺ 채널'이나 미오신 라이트 체인 인산분해효소(myosin light-chain phosphatase)의 활성을 증가시키는데, 이를 통해 혈관이완을 유도하게 된다.
- [0006] 혈관건강을 유지하기 위한 또 다른 방법은 혈관 내 이물질의 축적을 막는 것이다. 특히, 혈관 내 죽종(atheroma) 생성과 유도에 영향을 미치는 다양한 세포부착분자(cell adhesion molecule, CAM) 중 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1) 및 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)의 발현을 억제하는 것은 혈관 건강유지를 위한 중요한 요소이다.
- [0007] 한편, 사람 혈관 내피세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)에서 종양괴사인자-알파(TNF- α)에 의해 증가된 ICAM-1과 VCAM-1의 발현을 저해하는 것은 죽상동맥경화의 개선에 도움이 될 수 있는 것으로 보고되었다. TNF- α 에 의해 증가된 HUVEC의 증식(proliferation)은 혈관신생에 영향을 주어 암세포의 성장을 도울 수 있고, 건선 등의 혈관생성에 의한 질병을 유발할 수 있으므로, 이를 저해시키는 것은 항암과 함께 혈관신생에 의해 발생할 수 있는 질병예방의 효과를 기대할 수 있기 때문이다.
- [0008] 동맥경화를 치료하기 위한 약물은 이미 많이 개발되어 있으나, 기존의 의약품들은 부작용을 내포하고 있고, 일부 약물은 심각한 부작용을 수반하여 그 사용이 제한되기도 하였다. 그리하여, 부작용이 비교적 적은 천연 물질을 이용하여 동맥경화를 치료 또는 예방하고자 하는 노력들이 많이 경주되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제10-2009-0079584호 (공개일자 2009년 07월 22일)에는, 생강나무 추출물을 포함하는 심혈관계 질환의 치료 및 예방을 위한 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 혈관질환의 주요원인인 NAD(P)H 옥시다제(oxidase)를 강력하게 저해하는 동시에, 혈관평활근(vascular smooth muscle)의 수축과 이완을 조절하여 강력한 혈관이완 효과를 나타내어 혈압조절 및 혈관내피 세포기능장애(endothelial dysfunction)를 개선시켜 심혈관계 질환의 예방 및 치료를 위한 의약품 또는 건강기능식품으로 이용될 수 있는 기술이 공개되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 천연물로서 산초 열매유를 이용하여 부작용이 없으면서도 우수한 항동맥경화 효능을 가진 조성물을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 산초 열매유를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 동맥경화 예방 또는 개선용 식품 조성물을

제공한다.

[0012] 본 발명에서 '유효성분으로 함유하는 것'의 의미는 본 발명 식품 조성물의 동맥경화 예방 또는 개선의 효과가 본 발명의 산초 열매유로부터 발생하는 것을 의미하며, 여타의 성분, 일 예로 식품 안정제, 보조제, 제형제 등이 첨가될 수 있음을 의미한다. 또한, 동맥경화 예방 또는 개선에 효과가 좋은 다른 성분도 첨가될 수 있음을 의미한다.

[0013] 본 발명은 특정의 식품 제형으로 한정되는 것은 아니며, 음료에 첨가되어 공지의 음료 형태로 제형화될 수 있고, 그 외 다른 공지의 완제품 식품 제형에 보조제로 첨가될 수도 있다.

[0014] 산초(*Zanthoxylum schinfolium*)는 소염, 식욕증진 등에 효능이 있으며, 올레인산과 리놀산 같은 불포화지방산을 많이 함유하고 있다. 민간요법으로는 산초기름이 소화기 계통 질환에 효과가 있는 것으로 알려져 위장병, 기관지 천식에 좋은 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다.

[0015] 본 발명에서는 산초 열매유를 이용하여 사람 혈관 내피세포(human umbilical vein endothelial cell)에 처리하여, 혈관이완인자인 내피성 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase)에 미치는 영향과 혈관부착인자인 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 및 vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1에 미치는 영향을 확인하였는데, 실험 결과, 본 발명이 동맥경화 예방 또는 개선에 우수한 효능을 발휘함을 확인할 수 있었다.

[0016] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 산초 열매유는 바람직하게 산초 열매에 추출용매로 지용성 용매를 가하여 추출함으로써 수득한 것을 사용하는 것이 좋고, 지용성 용매는 일 예로 헥산을 사용할 수 있다.

[0017] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 산초 열매유는, 산초 열매에 지용성 용매를 가하여 초음파 추출하는 단계 (a); 상기 추출 후, 침지시키는 단계 (b); 및 상기 침지 후, 여과 및 농축하는 단계 (c);를 포함하는 과정으로부터 수득한 것을 사용하는 것이 더욱 좋다. 이하, 상기 단계에서 대해 각 단계별로 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0018] <단계 (a): 초음파 추출>

[0019] 본 단계는 산초 열매에 지용성 용매를 가하여 초음파 추출하는 단계이다.

[0020] 본 단계에서는 추출용매로 지용성 용매를 사용함으로써 산초 열매(종실)에 있는 지용성 물질, 즉 유(油) 성분을 추출할 수 있다. 지용성 용매는 일 예로, 헥산을 사용할 수 있고, 바람직하게 산초 열매의 무게 대비 2~5배 만큼 산초 열매에 첨가하는 것이 좋다.

[0021] 한편, 본 단계에서는 산초 열매로 바람직하게 분쇄한 산초 열매를 사용하는 것이 좋은데, 분쇄도는 15~25 메쉬(mesh) 정도가 좋다.

[0022] 한편, 본 단계는 초음파를 가하여 초음파 추출을 하는데, 초음파는 50~70 Hz의 강도를 갖는 것을 사용하는 것이 좋고, 시간은 15~30분 정도 추출하는 것이 좋다.

[0023] <단계 (b): 침지>

[0024] 본 단계는 상기 추출 후, 침지시키는 단계이다. 침지를 통해 초음파 후 여기된 추출액의 상태를 안정화시킬 수 있고, 산초 열매 내에 있는 지용성 성분들의 용출을 극대화할 수 있다. 이때, 침지는 바람직하게 3~7℃ 온도에서 12~36 시간 동안 수행하는 것이 좋다.

[0025] <단계 (c): 여과 및 농축>

[0026] 본 단계는 상기 침지 후, 여과 및 농축하는 단계이다. 여과를 통해 추출박을 제거함으로써 추출액을 깨끗이 수득할 수 있다. 여과는 종이 필터(filter paper) 또는 글라스 화이버 필터(glass fiber filter)를 사용할 수 있는데, 바람직하게는 종이 필터를 이용해 먼저 거르고, 그 후, 글라스 화이버 필터를 통해 한 번 더 여과하는 것이 좋다.

[0027] 한편, 여과된 추출액은 농축 과정을 거쳐 부피를 최소화할 수 있다. 농축은 감압하에 40~45℃의 온도로 수행하는 것이 좋다. 이를 통해, 유용성분의 파괴를 최소화할 수 있기 때문이다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 조성물은 천연물 유래이기 때문에 부작용이 없고, 본 발명의 실험 결과 우수한 항동맥경화 효능을 보이는 것으로 확인되었다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명 산초 열매유 생산공정을 보여준다.
- 도 2는 본 발명 산초 열매유가 HUVECs에 미치는 세포 독성 결과를 보여준다.
- 도 3은 본 발명 산초 열매유가 HUVECs에서 eNOS 생성에 미치는 영향을 보여준다.
- 도 4는 본 발명 산초 열매유가 HUVECs에서 VCAM-1/ICAM-1 단백질 발현에 미치는 영향을 보여준다.
- 도 5는 고지방식이와 본 발명 산초 열매유를 공급한 SD-rat의 혈중 콜레스테롤(cholesterol) 변화량을 보여준다.
- 도 6은 고지방식이와 본 발명 산초 열매유를 공급한 SD-rat의 혈중 트리글리세리드(triglyceride) 변화량을 보여준다.
- 도 7은 고지방식이와 본 발명 산초 열매유를 공급한 SD-rat의 혈중 HDL-콜레스테롤(cholesterol) 변화량을 보여준다.
- 도 8은 고지방식이와 본 발명 산초 열매유를 공급한 SD-rat의 혈중 LDL-콜레스테롤(cholesterol) 변화량을 보여준다.
- 도 9는 고지방식이와 본 발명 산초 열매유를 공급한 SD-rat의 혈중 동맥경화지수(atherogenic index) 변화량을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: 본 발명의 산초 열매유 제조]

- [0032] 산초 열매를 20 메쉬(mesh)로 분쇄한 후, 500 g을 취하고, 여기에 노멀 헥산(n-hexane) 1.4 L를 첨가하였다. 이후, 초음파를 가하여 30분 동안 추출하고, 5℃의 온도에서 24시간 동안 침지시켰다.
- [0033] 침지 후, 왓만 No.2 필터 페이퍼(Whatman No.2 filter paper)를 이용하여 1차 여과를 수행한 후, 'Advantec GF-75' 글라스 화이버 필터(Glass fiber filter)를 사용하여 2차 여과를 수행하였다.
- [0034] 2차 여과 후, 45℃에서 감압농축을 하여 하기 실험에서 사용할 산초 열매유 샘플을 최종 제조하였다 (도 1참조).

[실험예 1: HUVEC를 이용한 항동맥경화 효능 검증]

- [0036] 1) HUVEC 배양
- [0037] 강원대학교 혈관연구센터에서 분양받은 인간 제대혈 유래 혈관 내피세포(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)는 DMEM(dulbecco's modified eagle's medium)에 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)과 1% 항생제 (Penicillin and streptomycin)를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기(incubator)에 적응시킨 후 배양하였다.
- [0038] 충분한 세포를 얻기 위하여 T75 플라스크에서 세포를 배양하였고, T75 플라스크 바닥에 60%가량 세포가 배양되면 트립신-이디티에이(trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid, trypsin-EDTA) 용액(1x)을 사용하여 부착된 세포를 떼어 낸 후, 계대배양을 실시하였다.

[0039] 2) 산초 열매유의 HUVECs에 미치는 독성 측정

[0040] ① 실험방법

[0041] 배양이 완료된 세포를 96 웰 조직 배양 플레이트(tissue culture plate)에 1×10^4 cells/ml로 100 μ L씩 분주하고 24시간 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 산초 열매유를 DMSO에 녹인 뒤 농도별로 배양용 배지에 희석하여 세포에 처리하고 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후, 배양중인 배지에 CCK-8 시약 용액을 10 μ L 가해주고, 다시 37°C에서 3시간 더 배양하여 테트라졸리움 염(tetrazolium salt)을 환원시킨 후 생성된 포르마잔(formazan)을 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 검증하였다.

[0042] ② 실험결과

[0043] 도 2에서 보는 바와 같이, 산초 열매유 0.01~0.1 mg/ml의 농도에서는 세포 생존율이 100% 이상으로 나타났고, 0.2 mg/ml의 농도에서도 약 80% 정도의 세포 생존율을 나타냈다.

[0044] 3) 산초 열매유의 일산화질소 분비량 측정

[0045] ① 실험방법

[0046] 산초 열매유의 일산화질소 분비량은 그리스 시약(Griess Reagent)을 이용하여 확인하였다. HUVEC을 96 웰 조직 배양 플레이트에 1×10^5 cells/well로 100 μ L씩 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 산초 열매유를 DMSO에 녹인 뒤 FBS가 첨가되지 않은 배지에 농도별로 희석 및 TNF- α (100 ng/ml)를 세포에 처리한 후, 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 24시간 후, 배양중인 배지 100 μ L에 동량의 그리스(Griess) 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 ELISA 마이크로플레이트 리더(microplate reader; EL808; BioTek, Winooski, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0047] ② 실험결과

[0048] 도 3에서 보는 바와 같이, TNF- α 처리시 산초 열매유 0.05 mg/ml 이상의 농도에서는 산화질소 합성효소(Nitric oxide synthase, NOS)의 활성이 대조군 대비 100% 이상으로 나타났고, 0.01 mg/ml의 농도에서도 대조군 대비 90% 정도로 나타났다.

[0049] 4) 산초 열매유의 VCAM-1/ICAM-1 단백질 발현에 미치는 영향

[0050] ① 실험방법

[0051] · 세포 내 단백질 추출 : HUVEC에 산초 열매유를 0.1 mg/ml의 농도로 24시간 처리한 뒤 배지를 제거한 후, 셀 스크래퍼(cell scraper)로 웰(well) 바닥에 붙어있는 세포를 모두 회수하여 1.5 ml 튜브로 옮긴 후 단백질 추출 용액(protein extraction solution)을 가하고 1분간 강하게 볼텍싱한 후 -20°C에서 20분간 보관하였다. 용액을 12,000 g, 4°C에서 5분간 원심분리하여 상층액을 이용하여 실험에 사용하였다.

[0052] · 단백질 정량 : 추출한 단백질 5 μ L에 증류수 595 μ L를 넣어 희석한 후 브래드포드(bradford) 시약 200 μ L와 증류수 200 μ L를 넣어준 후 5초간 볼텍싱하여 섞어 준 후 5분간 반응시킨 뒤 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 BSA 용액을 이용하여 정량하였다.

[0053] · 멤브레인 dot팅(Membrane dotting) : 분리해 낸 단백질과 6x 로딩 다이(loading dye)를 5:1의 비율로 배합한 뒤 95°C에서 6분간 끓여 준비하였다. 준비된 샘플 단백질을 멤브레인에 일정 간격으로 3 μ g/2 μ l씩 dot팅(dotting) 하여 실온에서 1시간 건조하였다.

[0054] · 블로킹(Blocking) 및 항체 반응(antibody reaction) : 멤브레인에 단백질 이외의 부분에 항체가 반응하지 않도록 5% 스킵 밀크 용액(skim milk solution)에 2시간 동안 처리한 후 멤브레인을 TBS-T 버퍼를 이용하여 세척한 후, 표적 단백질에 반응하는 1차 항체(primary antibody, 1% BSA solution)를 2시간 동안 처리하고, 2차 항체(secondary antibody, 5% skim milk solution)에 40분 동안 처리한 후 TBS-T 버퍼를 이용하여 세척하였다.

[0055] · 화학발광 검출(chemilluminescence detection) : 멤브레인 상에서 항체 결합 유무를 확인하기 위하여 멤브레인에 웨스턴 검출 용액(western detection solution, substrate, enhancer 각 1 ml)을 도포한 후 암실에서 멤브레인을 감광시켜 밴드를 확인하여 단백질 발현 정도를 확인한 뒤 그 밴드의 강도를 Image J (National institutes of health, USA) 소프트웨어에 의해 정량분석하였고, 내부 표준물질로서 GAPDH를 사용하였다.

[0056] ② 실험결과

[0057] 도 4에서 보는 바와 같이, 산초 열매유를 처리할 경우, VCAM-1 단백질 및 ICAM-1 단백질의 발현이 줄어들 수 있었다.

[0058] [실험예 2: 쥐 모델을 이용한 항동맥경화 효능 검증]

[0059] 1) 실험 동물 준비

[0060] 본 실험에서는 SD-rat을 이용하여 산초 열매유의 항동맥경화 효능을 검증하고 동물 실험을 수행하였다. 실험을 위해, 10주령의 'sprague dawley rat(SD rat)'을 이용하여 20±5℃, 습도 55~60%, 12hr 명암 주기의 조건에서 표준식사와 물을 충분히 공급하여 1주일간 환경적응을 위해 사육하였다. 적응이 완료된 SD rat을 난괴법을 이용하여 각 실험군으로 분류하였으며, 일반식이군(normal), 고지방/고콜레스테롤군(HFHC), 심바스타틴 투여군(HFHC+simvastatin), 핵산을 이용하여 추출한 산초 열매유를 고지방/고콜레스테롤 식이군에 7, 15 %로 배합한 뒤 공급한 투여군으로 구분하여서 식이를 투여하였다. 4주간 고지방/고콜레스테롤 식이를 투여하여 비만/동맥경화를 유발하였으며, 심바스타틴(simvastatin) 및 식물성유지를 식이에 혼합하여 산초 열매유의 항동맥경화 효능을 확인하였다.

표 1

식이별 실험군

[0061]

일반 식이군		고지방 고콜레스테롤 식이군		고지방 고콜레스테롤 식이군 + 심바스타틴 (simvastatin)		고지방 고콜레스테롤 식이군 + 식물성유지 섭취군
↓		↓		↓		↓
Normal		HFHC		HFHC + simvastatin 0.02g/kg diet		HFHC + 산초 열매유 7, 15 %

표 2

식이조성표

[0062]

	Normal	HFHC	HFHC + 심바스타틴 (Simvastatin)	HFHC + oil 7%	HFHC + oil 15%
카제인(Casein)	200	200	200	200	200
옥수수 전분 (Corn Starch)	223	223	223	223	223
수크로스 (Sucrose)	250	250	250	250	250
셀룰로스 (Cellulose)	50	50	50	50	50
식물성 유지 (Vegetable oil)				70	150

콩기름 (Soybean Oil)	70	150	150	80	
라드(Lard)		70	70	70	70
혼합 미네랄 (Mineral Mix)	35	48	48	48	48
혼합 비타민 (Vitamin Mix)	10	21	21	21	21
콜레스테롤 (Cholesterol)		12.5	12.5	12.5	12.5
담즙산 (Cholic acid)		5	5	5	5
Drug			0.02		

[0063] 2) 혈액 내 지질의 생화학적 분석

[0064] 혈액 내 지질의 생화학적 분석을 위해 혈액을 SD-rat으로부터 꼬리에서 혈액을 채취한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻어 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC), 중성지방(triglyceride, TG), 고밀도 지단백질 콜레스테롤(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)의 함량을 다음과 같이 측정하였다.

[0065] 3) 총콜레스테롤 측정

[0066] 혈장 내 총콜레스테롤 측정은 아산세트 총콜레스테롤 측정용시액(AM 202-K, ASAN, Korea)을 이용하여 측정하였다. 효소시약을 완충용액에 희석시킨 후 혈청과 표준액(cholesterol 300 mg/dL) 각각 0.02 ml에 효소시액 3 ml를 넣고 잘 혼합하여 37℃에서 5분간 반응시킨 뒤 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

[0067] [수학식 1]

[0068]
$$\text{총콜레스테롤량}(mg/dL) = \frac{\text{검체의흡광도}}{\text{표준액의흡광도}} \times \text{표준액의농도}$$

[0069] 실험 결과, 도 5에서 보는 바와 같이 산초 열매유를 첨가하여 식이한 경우, 총 콜레스테롤의 함량이 줄어들음을 확인할 수 있었다.

[0070]

[0071] 4) 혈장 내 중성지방량 측정

[0072] 혈장 내 중성지방량 측정은 아산세트 총콜레스테롤 측정용시액(AM 157S-K, ASAN, Korea)을 이용하여 측정하였다. 효소시약을 완충용액에 희석시킨 후 혈청과 표준액(triglyceride 300 mg/dL) 각각 0.02 ml에 효소시액 3 ml를 넣고 잘 혼합하여 37℃에서 10분간 반응시킨 뒤 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

[0073] [수학식 2]

[0074]
$$\text{중성지방량}(mg/dL) = \frac{\text{검체의흡광도}}{\text{표준액의흡광도}} \times 300$$

[0075] 실험결과, 도 6에서 보는 바와 같이, 산초 열매유를 첨가하여 식이하는 경우 중성지방의 함량이 증가함을 확인할 수 있었다.

[0076] 5) HDL-콜레스테롤 측정

[0077] 혈장 내 HDL-콜레스테롤 측정은 아산세트 'HDL-Cholestase(AM 203, ASAN, Korea)'을 이용하여 측정하였다. 혈청 0.2 ml에 분리시약 0.2 ml를 넣고 잘 혼합하여 10분간 실온에서 방치 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 사용하였다. 효소시약을 완충용액에 희석시킨 후 혈청과 표준액(cholesterol 50 mg/dL) 각각

0.1 ml에 효소시액 3 ml를 넣고 잘 혼합하여 37℃에서 5분간 반응시킨 뒤 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

[0078] [수학식 3]

$$HDL\text{-cholesterol}\text{량}(mg/dL) = \frac{\text{검체의흡광도}}{\text{표준액의흡광도}} \times 50 \times 2$$

[0079]

[0080] 실험결과, 도 7에서 보는 바와 같이, 산초 열매유를 첨가하여 식이한 경우 HDL-콜레스테롤의 함량이 증가함을 확인할 수 있었다.

[0081] 6) LDL-콜레스테롤 측정

[0082] 혈장 내 LDL-콜레스테롤 함량은 프리에드왈트(Friedewald)의 계산방법 (Clinical Chemistry June 1972 vol. 18 no. 6 499-502)을 이용하여 다음과 같이 계산하였다.

[0083] [수학식 4]

$$LDLc = (TC - HDLc) - \frac{TG}{5}$$

[0084]

[0085] 실험결과, 도 8에서 보는 바와 같이 산초 열매유를 첨가하여 식이한 경우 LDL-콜레스테롤 함량이 줄어들음을 확인할 수 있었다.

[0086] 7) 동맥경화지수 계산

[0087] 동맥경화에 대한 위험성 척도를 알려주는 동맥경화지수(Atherogenic index)는 다음의 계산방법을 이용하여 계산하였다.

[0088] [수학식 5]

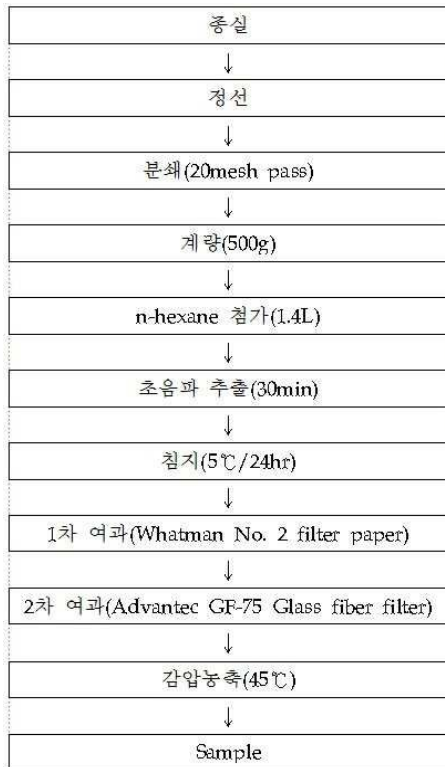
$$\text{Atherogenic index} = \frac{\text{Total cholesterol}}{\text{HDL}}$$

[0089]

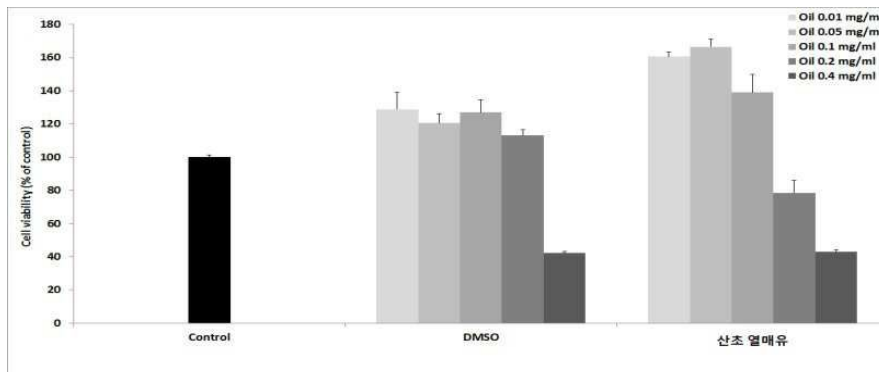
[0090] 계산 결과, 도 9에서 보는 바와 같이 산초 열매유를 첨가하여 식이한 경우 동맥경화지수가 낮게 나타남을 확인할 수 있었다.

도면

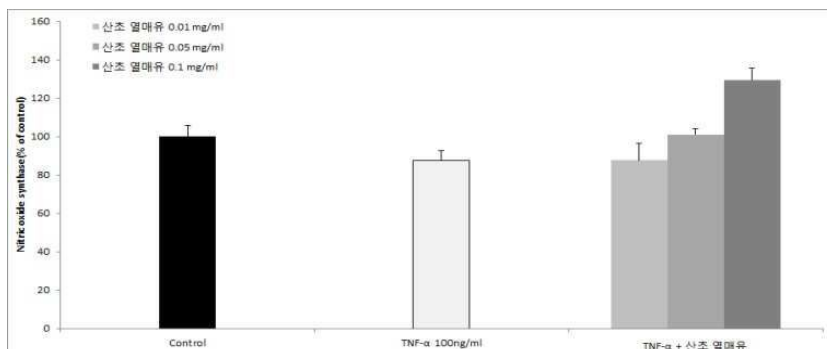
도면1



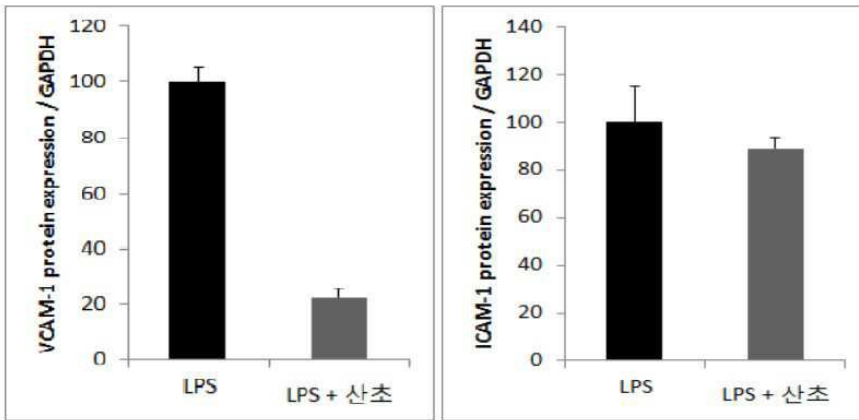
도면2



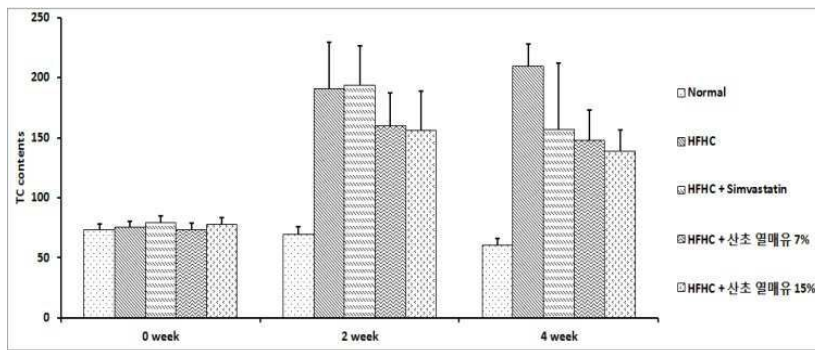
도면3



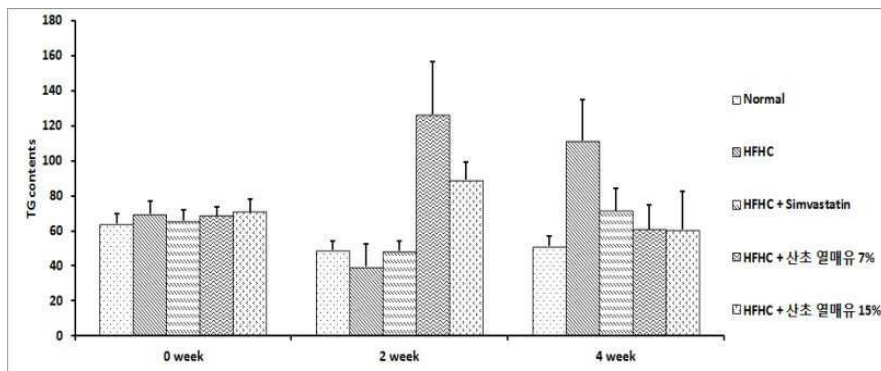
도면4



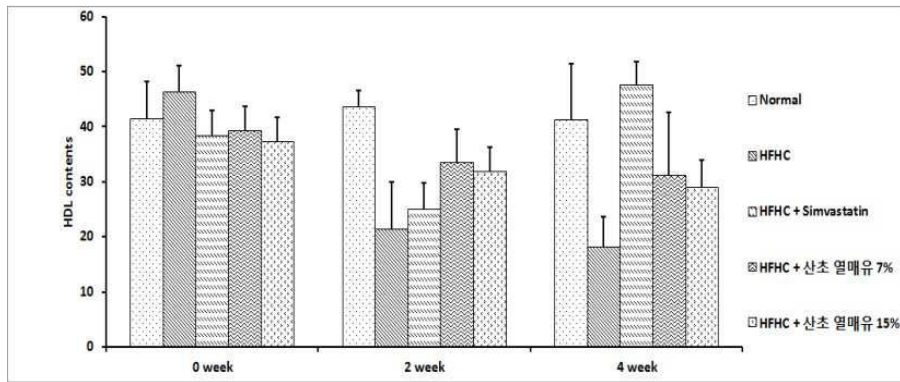
도면5



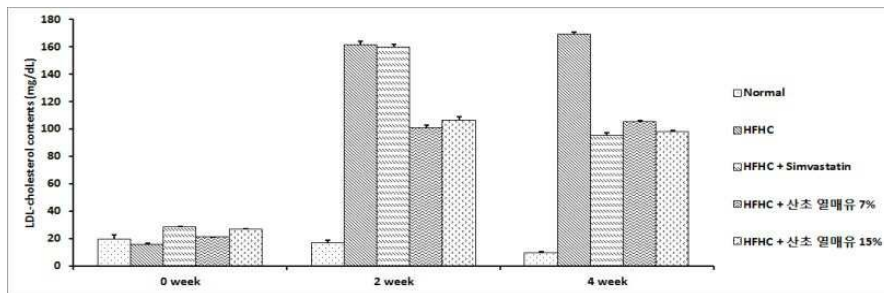
도면6



도면7



도면8



도면9

