

녹차씨 주정추출물의 카페인 함량 평가와 고지방식이 비만유도 C57BL/6 마우스와 3T3-L1 지방전구세포의 항비만효과

정명아 · 이현미 · 오둘리 · 김유진 · 배동혁 · 오교녀 · 신희찬¹ · 김선오*

(재)전남생물산업진흥원 천연자원연구센터, 1:명인신광수차

Quantitative Determination of Caffeine of Green Tea Seed Ethanol Extract on Anti-obesity in C57BL/6 Mice Fed a High-fat Diet and 3T3-L1 Cells

Myung-A Jung, Hyunmi Lee, Dool-Ri Oh, Yu jin Kim, Dong Hyuck Bae, Kyo-nyeo Oh, Heechan Shin¹, Sunoh Kim*

Jeonnam Bioindustry Foundation, Center of Natural Resources Research (JCNR),
1: Myungin Shin Gwangsu Cha

The study was carried out to examine the anti-obesity effects of 40% ethanol extract from green tea seed (GS) and quantitative determination of caffeine as its major compound. The specificity was satisfied with retention time and UV spectrum by analysis of caffeine using HPLC and comparison with standard compound. It showed a high linearity in the calibration curve with a coefficient of correlation (R^2) of 0.9974. The amount of caffeine in GS was about 4.649 mg/g (0.465%) in the three times analysis, and relative standard deviation (RSD) was less than 0.452% by the validated method. The anti-obesity effects of GS were evaluated by using Oil Red O staining in 3T3-L1 adipocytes and body weight, visceral fat and lipid profiles in high fat diet (HFD)-induced C57BL/6 obese mice. Our results indicated that treatment with GS dose-dependently decreased lipid accumulation contents ($p < 0.001$). Moreover, after oral administration for 30 days feeding with HFD-induced obese mice, GS (100 and 300 mg/kg/day) produced a significant decrease in serum total cholesterol (TC), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) and visceral fat. Thus, the result of this study indicate that the GS may be a useful resource for the management of obesity.

keywords : Green tea seed, Caffeine, 3T3-L1, High fat diet, Cholesterol, Visceral fat

서 론

비만은 에너지 섭취량이 에너지 소비량을 증가하여 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 의미하는 것으로 유전적, 환경적, 심리적 요인 등 여러 요인이 복합적으로 작용하여 나타나며 비만으로 인해 제2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등 각종 질환의 발생 위험에 직접적으로 영향을 미치고 있다¹⁾. 내장지방의 축적을 중심으로 한 비만은 염증 질환의 주된 원인으로 간주됨은 물론 혈중 LDL-cholesterol, 중성지방의 증가, HDL-cholesterol 농도의 감소, 인슐린 저항성을 증가시켜 심혈관 질환을 유발한다²⁾.

동백과(Theaceae)에 속하는 녹차(Green tea)는 동백속(Camellia)의 *Camellia sinensis* L. 학명으로 잎, 꽃, 줄기, 씨의

모든 부위가 식용이 가능한 상록 활엽 관목에 속한다. 녹차 잎의 성분 중 polyphenols은 잎 건조량의 10~30%를 차지하고 있으며 종류로는 caffeine, catechines, flavanols, flavanones, phenolic acids 등이 보고되어있다³⁾. 녹차잎은 생리활성물질로서 활발한 연구가 되고 있으며 향산화^{4,5)}, 항균⁶⁾, 항암⁷⁾ 등 다양한 생리활성에 대한 효능이 알려져 있다.

그러나 녹차 잎 외에 꽃, 줄기, 씨는 식용 등 활용가치가 높음에도 불구하고 기능성 및 활용 방법에 관한 연구가 미흡한 실정이다. 최근 녹차잎 외에 녹차씨 기름(oil)의 성분 및 기능성을 연구하여 동맥경화 예방⁸⁾, 항염증⁹⁾, 항균 및 항암¹⁰⁾, 향산화¹¹⁾ 등이 생리활성이 보고되어 있다. 그중 녹차씨 기름을 기능성이 있는 식용기름으로서의 가치를 판단하기 위해 콜레스테롤 저하, 향산화 및 염

* Corresponding author

Sunoh Kim, Jeonnam Bioindustry Foundation, Center of Natural Resources Research (JCNR), 288, Woodland-gil, Anyang-myeon, Jangheung-gun, Jeollanamdo, 59338, Korea

E-mail : sunoh@korea.ac.kr Tel : +82-61-860-2610

Received : 2015/11/18 Revised : 2016/02/01 Accepted : 2016/03/09

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.04.30.2.88

Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

증반응에 대한 연구결과가 보고되었고, 일반적인 옥수수 기름이나 올리브 오일과 유의한 차이가 없다고 보고되고 있다¹²⁾.

최근 들어 녹차씨의 일반성분 함량¹³⁾ 및 녹차나무 뿌리와 씨의 영양성분 분석¹³⁾ 등의 연구를 통해 녹차 나무에 존재하는 polyphenol, 무기성분, 아미노산성분 등의 부위별 함량 분석이 연구되어짐에 따라 성분 함량에 따른 기능성에 맞게 부위별 활용이 가능하여 녹차나무의 활용 방법이 다양해지고 있다.

이러한 녹차잎 외에 다른 부위의 기능성 및 성분 탐색 연구를 통해 녹차나무의 활용 가능성이 높아짐에 따라 식품, 의약품, 건강기능식품 등의 제품화 가능성 연구가 필요한 실정이며, 국내 보건 의료 정책이 치료에서 예방, 관리 중심으로 변화하면서 건강기능식품의 중요성이 강조되고 있기 때문에 현재까지 많은 항비만 효능을 나타내는 기능성 식품 제품이 개발되고 있다.

따라서 본 연구에서는 기름이 추출되지 않는 조건인 녹차씨 주정추출물의 원료 표준화 및 녹차씨의 기능성을 재검정하고 건강기능식품 및 식의약 소재로써 녹차씨의 활용방안을 모색하고자 녹차씨 40% 주정 추출법을 확립하고 지표성분으로서 caffeine의 분석법 확립과 정량분석을 하였고, 이를 바탕으로 녹차씨 40% 주정 추출물이 항비만 효과가 있는 지를 규명하기 위하여 3T3-L1 cell line을 이용하여 지방축적 억제 효과 및 고지방식이 동물 모델을 이용하여 비만 개선 효과를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

녹차씨는 전남 순천시에서 재배되고 있는 재래종 녹차씨를 (주)명인신광수차로부터 공급받아 사용하였다. 시료 추출은 녹차씨 껍질을 분리 제거하고 균질하게 파쇄 하여 완전 건조 후 사용하였다. 건조된 녹차씨 분말을 기름이 추출되어 나오지 않는 조건인 40% 주정을 첨가하여 100°C에서 3시간동안 3반복 환류 추출하였다. 40% 주정 추출액을 여과지로 여과 한 후 대형회전진공농축기 (Buchi rotavapor R-220, Grc-hwader strasse, Flawil, Switzerland)에서 45°C로 감압 농축하여 용매를 제거한 후 동결건조기(삼원냉열, 100 L)를 이용하여 분말화 하였다. 분말화가 완벽하게 이루어진 것을 확인하여 기름이 추출되지 않았음을 확인하였고, 제조된 분말은 4°C에서 냉장보관 하여 실험 시 사용하였다.

2. 녹차씨 시료 전처리

녹차씨 40% 주정 추출물의 동결건조물 1 g을 100 mL-volumetric flask에 100% methanol로 종용한 뒤 1시간동안 sonicator (powersonic 520, Hwashin, Korea)를 이용해서 추출하였다. 이를 0.45 µm membrane filter (Advantec, PTFE, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)로 여과 한 뒤 HPLC 분석을 위한 최종 시료로 사용하였다.

3. Caffeine 표준용액 조제

Caffeine (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA) 표준물질은 methanol (J.T.Baker®, AVANTOR, USA)에 녹여 500

ppm이 되도록 stock standard solution을 제조하였다. 이 용액을 단계적으로 희석하여 농도가 30, 60, 120, 250 ppm으로 총 4개 구간을 설정하여 최종 working standard solution으로 하였다. 이를 이용하여 Caffeine의 함량을 구하기 위해서 표준용액의 크로마토그램으로부터 얻은 peak area와 농도와의 상관관계를 이용하여 검량선을 작성하였다.

4. HPLC 분석 조건

녹차씨의 Caffeine 함량 분석을 위한 HPLC 조건은 Table 1과 같다. 크로마토그램을 얻기 위한 분리용 고정상 컬럼은 Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 µm, Agilent, USA)을 사용하였다. UV/VIS 검출기를 가진 Waters 2695 HPLC System (Waters, Milford, MA, USA)을 기기분석으로 이용하였다. 이동상 A에는 1% formic acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Japan)가 첨가된 water (J.T.Baker®, AVANTOR, USA), 이동상 B에는 methanol (J.T.Baker®, AVANTOR, USA)을 1 mL/min으로 흘러주었으며, gradient조건은 Table 2와 같다. 10 µL 시료를 주입하여 UV 210 nm 파장에서 측정하였다.

Table 1. The HPLC operating condition for caffeine analyses

Item	Condition
HPLC system	Waters 2695
Column	Eclipse XDB-C ₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 µm)
Flow rate	1.0 mL/min
UV Detector	254 nm
Column temperature	40°C
Injection volume	10 µL

Table 2. The gradient condition of mobile phase for caffeine HPLC analyses

Time(min)	% A*	% B**
0	10	90
10	10	90
15	12	88
20	14	86
30	20	80
40	26	74
45	35	65
50	50	50
60	90	10
65	10	90
75	10	90

* 1% formic acid in water. ** Methanol.

5. 세포배양

3T3-L1 전지방세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 세포 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Gibco Co, USA)에 10% Bovine serum (BS, Gibco Co, USA)과 1% penicillin-streptomycin (P/S, Gibco Co, USA)을 첨가하여 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 세포가 80~90% confluent되면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 6-well plate에 5 × 10⁴ cells/mL로 분주하였다. 2일후 배지를 교환하고 4일째에 세포가 post-confluent하게 되면 10% FBS (fetal bovine

serum)가 첨가된 DMEM 배양액에 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma Co, USA), 1 μ M dexamethasone (Sigma Co, USA), 10 μ g/mL insulin(Sigma Co, USA)이 처리하여 분화를 유도하였다. 분화유도 2일 후, 10 μ g/mL의 insulin. 10% FBS가 포함된 DMEM으로 교환하였고, 분화유도 4일째부터는 10% FBS가 포함된 DMEM으로 배양액을 교환하여 8일간 지방세포 분화를 유도하였다. 녹차씨 40% 주정추출물 시료는 분화시작일과 2, 4, 6일째 되던 날에 양성대조군 Orlistat (20 μ M)과 시료를 각각 농도별로 처리하였다.

6. Oil Red O 염색

Oil Red O stock solution은 0.35 g Oil Red O 시약을 100 mL의 isopropanol에 녹여 filter 하였다. Oil Red O working solution은 60%는 Oil Red O stock solution을 넣고 40%는 증류수를 넣어 실험에 사용하였다. 분화시작일로부터 8일째 되던 날 배지를 제거 후 phosphate-buffered saline (PBS)로 씻어낸 후 10% formaldehyde로 1시간 동안 고정하였다. 10% formaldehyde를 제거하고 증류수로 3회 세척 후 각 well에 Oil Red O working solution을 1 mL씩 넣고 실온에서 30분 동안 염색한 후 증류수로 3회 반복하여 씻어내었다. 염색이 된 지방구는 사진으로 기록하였고, 100% isopropanol을 가하여 세포내에 축적된 lipid를 용출하여 96 well plate에 옮긴 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 lipid accumulation 정도를 평가하였다.

7. 실험동물 및 식이

실험동물은 male C57BL/6 mice 5주령을 (주)샘타코 (Osan, Korea)에서 구입하여 1주일간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험군은 정상군(normal), 고지방식이대조군(high fat diet, HFD군), 고지방식이와 녹차씨 40% 주정추출물 100 mg/kg/day을 경구 투여한 GS 100군, 고지방식이와 녹차씨 40% 주정추출물 300 mg/kg/day을 경구 투여한 GS 300군으로 각 군당 5마리씩 총 4군으로 나누어 실험에 사용하였다. 물과 식이는 자유롭게 섭취시키면서 사육하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 습도 45 \pm 5%, 명암은 12시간 주기로 자동 조명 조절되었으며, 체중의 변화는 매주 기록하였다. 일반식은 Research Diets사(10% kcal from fat, D12450B Research diets, New Brunswick NJ, USA), 고지방 식이는 Research Diets사(60% kcal from fat, D12492 Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)에서 구입하였고, 그 조성은 Table 3과 같다.

8. 지방조직 무게 측정

실험식이 30일째에 mice를 희생시킨 후 지방조직(Epididymal fat, Retroperitoneal fat)을 적출하여 무게를 측정하였다.

9. 혈중 바이오마커의 분석

실험동물을 ethyl ether로 마취하여 심장에서 채혈하고, 채혈된 혈액은 실온에서 1시간 두었다가 3,000 rpm에서 20분간 원심

분리한 혈청을 분석시료로 사용하였다. 혈청의 총콜레스테롤, Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT), Gutamic yuvic tranaminase (GPT)를 자동 혈액 분석기(FUGIFILM DRI-CHEM 4000i, Minato-ku, Tokyo, japan)로 측정하였다.

10. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성 검정은 Student's t-test 분석법을 한 후 p값이 0.05 미만 ($p < 0.05$)인 경우를 통계학적으로 유의하다고 보았다.

Table 3. Composition of experimental diet

Ingredients	Normal (gm)	HFD (gm)
Casein, 80 Mesh	200	200
L-Cystine	3	3
Com Strach	315	0
Maltodextrin 10	35	125
Sucrose	350	68.8
Cellulose, BW200	50	50
Soybene Oil	25	25
Lard	20	245
Mineral Mix, S10026	10	10
DiCalcium Phosphate	13	13
Calcium Carbonate	5.5	5.5
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	16.5
Vitamin Mix, V10001	10	10
Choline Bitartrate	2	2
FD&C Blue Dye#1	0.05	0.05

결 과

1. Caffeine 함량

Caffeine 분석을 위하여 표준물질의 크로마토그램으로부터 얻은 피크(peak)의 농도별 면적 (area)에 대하여 검량선은 $y = 12001x + 70949$ 이었으며, 상관계수(R²)는 0.9974으로 우수한 직선성을 나타내었다. 이는 caffeine 표준용액이 농도별로 정확하게 회색되었음을 보여준다. 또한 Fig. 1에서와 같이 caffeine 표준용액 (a)과 녹차씨 40% 주정추출물 (b) 시험용액의 spectrum이 동일하고, 크로마토그램상의 머무름 시간(retention time)이 일치하였다. 본 연구에서 설정한 최적의 HPLC 분석법으로 caffeine을 정량하기 위해 시료는 세 번씩 반복 분석하여 함량을 계산하였으며 Table 4와 같다. 그 결과 녹차씨 40% 주정추출물의 caffeine 함량의 평균은 0.465%이며 기준값은 KFDA가 제시하는 지침¹⁴⁾에 따라 80~120%로 기준 규격을 설정 하였을 때 함량은 0.464~0.466%이다. 또한 일반적으로 허용수준인 RSD \leq 2%보다 낮은 %RSD로 HPLC 분석에서의 재현성을 확인하였다.

Table 4. Amount of caffeine 40% ethanol extract of Green tea seed (n=3)

Lot number	Mean (mg/g)	RSD(%) ¹⁾	Contents(%)
1	4.637 \pm 0.020	0.428	0.464
2	4.654 \pm 0.021	0.452	0.465
3	4.656 \pm 0.019	0.418	0.466

Values are expressed as the mean \pm S.D. 1) Relative standard deviation.

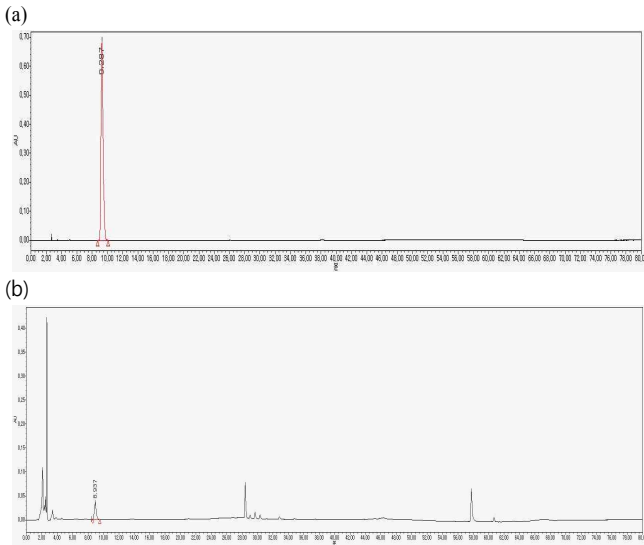


Fig. 1. HPLC chromatograms of (a)-caffeine standard, (b)-40% ethanol extract of Green tea seed.

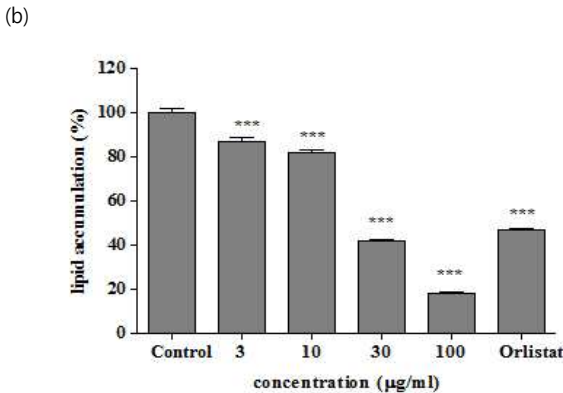
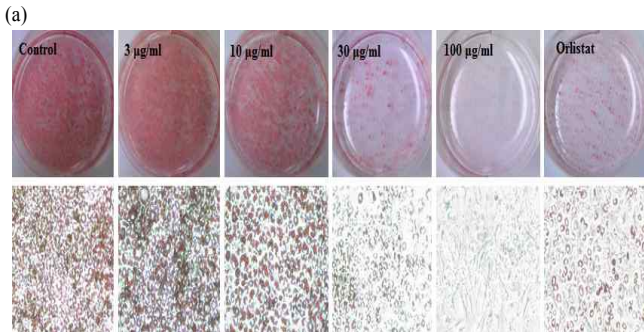


Fig. 2. The effect of a 40% ethanol extract of Green tea seed (GS) on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. (a) 3T3-L1 cells were differentiated with differentiation medium containing GS for 8 days. Lipid accumulation was evaluated by Oil Red O staining (magnification, 100×). (b) The intracellular lipid accumulation was quantified by Oil Red O staining. Orlistat (20 µM) was used as a positive control. Values are expressed as the mean ± S.E. (n=4). ***p<0.001 compared with the control.

2. Oil Red O 염색

녹차씨 40% 주정추출물을 처리한 세포 내 지방 축적에 대한 억제 효과를 측정하기 위하여 3T3-L1 세포의 지방세포의 분화 후 Oil Red O solution으로 염색하여 확인하였다(Fig. 2). 3T3-L1 전

지방세포를 8일간 분화 유도한 결과 Fig. 2(A)에서 보는 바와 같이 샘플을 처리하지 않고 분화를 유도하였을 경우에는 세포질 내 지방구 (lipid droplet)이 형성이 되어 성숙 지방세포의 형성이 잘 되었음을 사진이 붉게 염색된 것을 통해 확인하였다. 녹차씨 40% 주정추출물을 농도별로 (3, 10, 30, 100 µg/mL) 처리 하였을 때 각각 87, 81, 41, 19% 정도의 지방구 형성을 보였다(Fig. 2(B)). 특히 30, 100 µg/mL에 처리하였을 때 양성대조군인 orlistat (47%)보다 더 나은 지방 축적정도가 더 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

3. 체중증가량 및 식이섭취량

고지방식이와 함께 녹차씨 40% 주정추출물을 30일간 경구투여 후 체중증가량, 식이효율을 측정하였고 그 결과는 Table 5와 같다. 실험 시작시에는 각 군간의 체중 차이가 없었으나 실험 종료시 정상군 (21.80±0.65 g)보다 고지방식이군 (28.56±0.27 g)에서 유의적으로(p<0.001) 증가하여 고지방식으로 비만이 유도되었음을 확인 하였다. 녹차씨 40% 주정 추출물 투여군은 고지방식이군 (HFD)에 비교시 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군 (25.86±0.47 g), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군 (25.08±0.66 g)으로 유의하게 감소하였다 (p<0.01). 식이섭취량은 각 군 간에 유의차는 없었다.

Table 5. Effect of 40% ethanol green tea seed on body weight and food intake in mice fed high-fat diet for 30 days.

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Food intake (g/day)
ND	19.80±0.32	21.80±0.65	2.71±0.03
HFD	19.80±0.29	28.56±0.27***	2.42±0.01
GS 100	19.80±0.28	25.86±0.47**	2.53±0.02
GS 300	19.80±0.22	25.08±0.66**	2.43±0.01

Values are expressed as the mean ± S.E. (###p<0.001, significantly different from the ND group; **p<0.01, significantly different from the HFD group).

4. 지방조직의 무게

고지방식이를 섭취한 C57BL/6 mice에 녹차씨 40% 주정추출물을 30일간 경구투여 후 지방조직의 무게를 측정한 결과를 Table 6에 나타냈다. 부고환지방무게는 정상군 (0.26±0.02 g)보다 고지방식이군 (114.4±0.07 g)에서 유의한 증가를 보였으며 (p<0.001) 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군 (0.58±0.05 g), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군 (0.44±0.14 g)으로 유의하게 감소하였다 (p<0.001). 복부지방의 무게는 정상군인 ND군 (0.33±0.02 g)보다 고지방식이 급여군인 HFD군 (1.49±0.13 g)에서 유의한 증가를 보였으며 (p<0.001) 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군 (0.77±0.10 g), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군 (0.58±0.08 g)의 무게가 유의하게 낮은 것을 확인할 수 있었다 (p<0.01, p<0.001).

5. 생화학 분석

혈청의 총 콜레스테롤 농도는 Table 7에서와 같이 ND군 (138.2±2.4 mg/dL)에 비해 HFD군 (188.0±8.3 mg/dL)에서 유의하게 증가되었으며 (p<0.001). 고지방식이군인 HFD군에 비해 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군 (159.8±12.3 mg/dL), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군

(140.6±11.4 mg/dL)에서 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다 ($p<0.01$). 간손상 지표인 GOT와 GPT를 측정된 결과 GOT는 정상 ND군 (104.6±6.0 U/L)에 비해 고지방식이 HFD군 (127.8±12.5)에서 증가되었으며, 고지방식이 HFD군보다 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군 (116.2±13.7), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군 (101.0±7.8)에서 감소하는 경향을 보였다 (Table 7). GPT를 측정된 결과 ND군 (21.0±1.3 U/L)에 비해 고지방식이 HFD군 (33.6±2.6 U/L)에서 유의하게 증가되었으며 ($p<0.001$) 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군 (24.8±2.2 U/L), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군 (23.6±2.5 U/L)에서 유의한 감소 효과를 확인하였다 ($p<0.05$, $p<0.01$).

Table 6. Effect of 40% ethanol green tea seed on visceral fat in mice fed high-fat diet for 30 days.

	Epididymal fat (g)	Retroperitoneal fat (g)
ND	0.26±0.02	0.33±0.02
HFD	1.14±0.07 ^{###}	1.49±0.13 ^{###}
GS 100	0.58±0.05 ^{***}	0.77±0.10 ^{**}
GS 300	0.44±0.14 ^{***}	0.58±0.08 ^{***}

Values are expressed as the mean ± S.E. (### $p<0.001$, significantly different from the ND group; ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$, significantly different from the HFD group).

Table 7. Effect of 40% ethanol green tea seed on serum total cholesterol, GOT and GPT in mice fed high-fat diet for 30 days.

	Total cholesterol (mg/dL)	GOT (U/L)	GPT (U/L)
ND	138.2±2.4	104.6±6.0	21.0±1.3
HFD	188.0±8.3 ^{###}	127.8±12.5	33.6±2.6 ^{###}
GS 100	159.8±12.3	116.2±13.7	24.8±2.2 [*]
GS 300	140.6±11.4 ^{**}	101.0±7.8	23.6±2.5 ^{**}

Values are expressed as the mean ± S.E. (### $p<0.01$ and *** $p<0.001$, significantly different from the ND group; * $p<0.05$ and ** $p<0.01$, significantly different from the HFD group).

고찰

비만은 에너지 섭취량이 에너지 소비를 증가하여 체내에 지방이 과잉 축적된 상태로 제2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등 각종 질병의 원인으로 작용하고 있다. 내장지방의 축적을 중심으로 한 비만은 남녀노소를 불문하고 지속적으로 증가 추세에 있다¹⁵⁾.

현재까지 비만의 예방과 치료를 위한 많은 약물들이 사용되고 있으며 두통, 변비, 불면 등의 신경학적, 심리학적 부작용이 나타나고 있다. 따라서 복용 시 부작용을 낮출 수 있는 천연물의 생리활성 물질에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

녹차의 기능성 연구가 활발해짐에 따라 녹차의 수요 또한 큰 폭으로 상승하고 있으며, 녹차 잎 외에 꽃, 줄기, 씨는 식용 등 활용 가치가 높음에도 불구하고 기능성 및 활용방법에 관한 연구가 미비하여 활용되지 않고 폐기되어지는 실정이다. 이러한 녹차 잎 외에 다른 부위의 기능성 및 성분 탐색 연구를 통해 녹차나무의 활용 가능성이 높아짐에 따라 식품, 의약품, 건강기능식품 등의 제품화 가능성 연구가 필요한 실정이며, 본 연구를 통해 녹차씨 추출물의 건강기능식품 원료로 개발하기 위해 caffeine 함량을 측정하는 표준 분석법 연구를 진행하였고, 녹차씨를 활용한 항비만 활성 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 기름이 추출되지 않는 조건으로 제조된 녹차씨 40% 주정 추출물의 원료 표준화 및 기능성 식품 소재로 개발하고자 caffeine의 분석법 확립과 정량분석을 하였다. HPLC 분석 결과 R2는 0.9974으로 좋은 선형성을 보였다. 녹차씨 40% 주정 추출물 내의 caffeine의 함량은 세 lot를 3번씩 분석하였을 때 약 4.649 mg/g (0.465%)나왔으며 RSD값은 0.433%이었다. 또한 일반적으로 허용수준인 RSD≤2%보다 낮은 %RSD로 HPLC 분석에서의 재현성을 확인하였다. 본 연구결과는 건강기능식품 원료소재로서의 녹차씨 추출물의 표준화를 위해 지표성분을 caffeine으로 선정하고 분석 방법을 확립하여 선정된 지표성분과 표준분석법을 활용한 대량 생산화 추출공정의 표준화 정보를 확립하게 되었다.

지방세포 내의 지방구 (lipid droplet)는 지질 대사 및 조절에 중요한 역할을 하며 지방전구세포에서 지방세포로의 분화 시 중성지방의 합성을 증가시키고, 세포내 지방의 축적을 조절한다¹⁶⁾. 항비만 연구에 많이 이용되는 3T3-L1 지방전구세포는 분화전에는 전지방세포에서 분화 후에는 둥근 모양 구조의 지방세포로 성숙된다. 본 연구에서 3T3-L1 세포를 통해 40% 녹차씨 추출물을 첨가하여 지방축적의 정도를 확인한 결과 농도별로 (3, 10, 30, 100 µg/mL) 처리 하였을 때 각각 87, 81, 41, 19% 정도의 지방구 형성을 유의적으로 억제하는 것을 볼 수 있었다. 특히 농도 30, 100 µg/mL에 처리하였을 때 의약품으로 사용되고 있는 양성대조군인 orlistat 보다 중성지방의 축적에 대한 억제효과가 큰 것으로 보아 비만 예방에 효과적인 것으로 기대되며, 녹차씨 기름보다 녹차씨 40% 주정 추출물에서 비만을 억제하는 물질이 더욱 효과적으로 추출되고 있음을 알 수 있다.

본 연구에서는 이러한 세포 수준에서의 연구를 통해 지방세포 분화 억제효과가 실험동물에서도 효과가 나타나는지를 증명하기 위해 고지방식이 유도 비만 마우스모델을 이용하여 녹차씨 40% 주정 추출물을 투여하여 체중증가량, 식이섭취량, 지방무게 및 혈중 바이오마커에 미치는 영향을 조사하였다. 녹차씨 40% 주정 추출물의 항비만 효과를 조사하기 위해 30일간 경구 투여 후 체중증가량 및 식이 섭취량을 확인하였다. 그 결과 섭취 직후에는 체중변화가 그룹간 유의성은 없었으나 실험 종료시 최종 체중은 정상군 (21.80±0.65 g)보다 고지방식이군 (28.56±0.27 g)에서 유의적으로 증가하였고 고지방식이군에 비해 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군, (25.86±0.47 g), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군 (25.08±0.66 g)으로 유의성 있게 감소하였다 ($p<0.01$). 식이 섭취량의 경우 정상식이군, 고지방식이군과 고지방식이와 녹차씨40% 주정추출물을 같이 급여한 군에서 유의적인 차이는 없었다. 이상의 결과로 보아 녹차씨 40% 주정추출물의 체중감소는 식이 섭취량에 관계없이 체내 지질대사에 작용 또는 지방흡수를 저해하여 체중감소를 유도한 것으로 사료되며 이러한 결과는 녹차씨 기름보다 녹차씨 40% 주정추출물이 더욱 효과적으로 항비만 효과가 있음을 짐작할 수 있게 하였다.

체지방이 과도하게 축적되면 지방세포의 수와 크기가 증가하며, 인슐린 저항성, 당뇨병, 고혈압 등 각종 질환의 발병률을 증가시키며¹⁷⁾ 지방조직은 체내 지질대사에서 중요한 역할을 한다¹⁸⁾. 녹차씨 40% 주정 추출물의 항비만 효과를 조사하기 위해 30일간 경

구 투여 후 부고환지방과 복부지방의 무게를 측정된 결과 정상군인 ND군보다 고지방식이 급여군인 HFD군에서 유의한 증가를 보였으며 ($p < 0.001$) 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군과 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군의 부고환지방과 복부지방의 무게가 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.01$). 그러나 단순한 지방의 무게만으로는 기전규명이 어려우므로 앞으로 다양한 바이오마커를 이용하여 좀 더 자세한 기전 연구가 필요할 것으로 사료된다.

비만은 과다한 지방이 축적되어 다양한 원인에 의해 나타나는데 특히 내장 지방의 축적을 중심으로 한 비만은 염증 질환의 주된 원인으로 간주되며 고지방식이로 비만을 유도한 경우 중성지방과 콜레스테롤이 증가한다¹⁹. 고지방식이 급여에 의해 간 조직이 손상되며 GOT, GPT 활성의 증가는 혈청 콜레스테롤 함량을 증가시킨다고 보고되었다²⁰. 혈청의 총 콜레스테롤 농도는 정상식이군 (138.2 ± 2.4 mg/dL)에 비해 고지방식이군 (188.0 ± 8.3 mg/dL)에서 유의하게 증가되었다. ($p < 0.001$). 이러한 결과는 고지방식이를 급여하였을 경우 동물성 지방의 섭취비율이 높아 혈청 콜레스테롤 농도가 증가됨을 보고한 연구 결과와 유사하다²¹. 고지방식이군인 HFD군에 비해 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군 (159.8 ± 12.3 mg/dL), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군 (140.6 ± 11.4 mg/dL)에서 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.01$). 간 손상 지표인 GOT와 GPT를 측정된 결과 GOT는 정상식이 ND군 (104.6 ± 6.0 U/L)에 비해 고지방 식이 HFD군 (127.8 ± 12.5)에서 증가되었고, 이는 고지방식이를 섭취한 경우 GOT, GPT의 활성이 증가가 나타나는 실험결과와 일치하였다²². 고지방식이 HFD군보다 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군 (116.2 ± 13.7), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군 (101.0 ± 7.8)에서 감소하는 경향을 보였다(Table 7). GPT를 측정된 결과 ND군 (21.0 ± 1.3 U/L)에 비해 고지방 식이 HFD군 (33.6 ± 2.6 U/L)에서 유의하게 증가되었으며 ($p < 0.001$) 녹차씨 40% 주정 추출물 100 mg/kg/day 처리군 (24.8 ± 2.2 U/L), 녹차씨 40% 주정 추출물 300 mg/kg/day 처리군 (23.6 ± 2.5 U/L)에서 유의한 감소 효과를 확인하였다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

이상의 결과로 보아 본 연구를 통한 caffeine의 분석법을 통해 녹차씨 40% 주정추출물의 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위한 지표성분으로서 기초 자료로 활용 될 수 있을 것으로 사료되며, 세포 실험 및 동물실험을 통해 비만 예방 및 치료에 녹차씨 기름보다 녹차씨 40% 주정추출물이 더욱 효과적이라고 판단되며, 향후 건강 기능식품 소재로서의 개발에 가능성 있을 것으로 사료된다.

결 론

녹차씨 40% 주정 추출물의 원료 표준화 및 건강기능식품 소재로 개발하고자 본 연구에서는 녹차씨 40% 주정 추출물의 caffeine 표준분석법 확립과 정량분석을 하였다. 녹차씨 40% 주정 추출물의 항비만 효능을 규명하고자 3T3-L1 cell line을 이용하여 세포내 지방 축적 억제 효과를 Oil Red O 염색을 통해 확인한 결과 농도 의존적으로 유의한 억제 효과를 나타냈다. 또한 녹차씨 40% 주정 추

출물이 고지방식이 급여 마우스의 체중, 지방무게, 지질함량에 미치는 영향을 관찰한 결과 고지방식이군에 비해 녹차씨 40% 주정 추출물군에서 유의하게 감소되었다. 이상의 결과로 보아 녹차씨 40% 주정 추출물의 caffeine의 표준 분석법을 확립하고 녹차씨 40% 주정 추출물이 체중조절 및 지질대사에 효능이 있는 것을 확인 하였으며, 항 후 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위한 기초자료로 활용될 것으로 본다.

감사의 글

본 연구를 위해 녹차씨를 제공한 명인신광수차에 감사를 드리며, 본 연구는 농촌진흥청의 농업연구개발사업(과제번호: PJ008489)으로 수행된 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

1. Despres, J.P., Lemiux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444: 881-887, 2006.
2. Sharma, A.M. Adipose tissue: a mediator of cardiovascular risk. *Int J Obes Relat Metab Disord* 4: S5-S7, 2002.
3. Pan, X., Niu, G., Liu, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem Eng Process* 42: 129-133, 2003.
4. Yeo, S.G., Ahn, C.W., Lee, Y.W., Lee, T.K., Park, Y.H., Kim, S.B. Antioxidative effects of tea extracts from green tea, oolong tea, black tea. *J. Korean Soc. Food Nutr* 24: 299-304, 1995.
5. Nakayama, T., Yoshizaki, A., Izumida, S., Suehiro, T., Miura, S., Uemura, T., Yakata, Y., Shichjo, K., Yamashita, S., Sekin, I. Expression of interleukin-11 (IL-11) and IL-11 α in human gastric carcinoma and IL-11 upregulates the invasive activity of human gastric carcinoma cells. *Int J Oncol* 30: 825-833, 2007.
6. Sakanaka, S., Sato, T., Kim, M., Yamamoto, T. Inhibitory effects of green tea polyphenols on glucan synthesis and cellular adherence of cariogenic streptococci. *Agric Bio Chem* 51: 2925-2929, 1990.
7. Mukhtar, H., Ahmad, N. Mechanism of cancer chemopreventive activity of green tea. *Pro Soc Exp Biol Med* 200: 234-238, 1999.
8. Noh, K.H., Kim, J.K., Song, Y.S. Suppressive effects of ethyl acetate fraction from green tea seed coats on the production of cell adhesion molecules and inflammatory mediators in human umbilical vein endothelial cells. *J Korean Soc Food Sci Nut* 40: 635-641, 2001.
9. Noh, K.H., Jang, J.H., Min, K.H., Chinzorig R., Lee, M.O., Song, Y.S. Suppressive effect of green tea seed coat

- ethyl acetate fraction on inflammatory and its mechanism in RAW264.7 macrophage cell. *J Korean Soc Food Sci Nut* 40: 625-634, 2011.
10. Yoon, W.H., Choi, J.H., Lee, K.H., Kim, C.H. Antimicrobial and antitumor activities of seed extracts of *Camellia sinensis* L. *Korean J Food Sci Technol* 37: 108-112, 2012.
 11. Jo, Y.H., Yuk, H.G., Lee, J.H., Kim, J.C., Kim, L.M., Lee, S.C. Antioxidant, tyrosinase inhibitory, and acetylcholinesterase inhibitory activities of green tea (*Camellia sinensis* L.) seed and its pericarp. *Food Sci Biotechnol* 21: 761-768, 2012.
 12. Kim, J.K., Kim, S.O., Noh, K.H., Jang, J.H., Song, Y.S., Effects of Green Tea Seed Oil on the Cholesterol, TBARS and Inflammatory Responses in C57BL/6 Mice Fed High Cholesterol Diet. *J Korean Soc Food Sci Nut* 36: 284-290, 2007.
 13. Rah, H.H., Baik, S.O., Han, S.B., Bock, J.Y. Chemical compositions of the seed of Korean green tea plant (*Camellia sinensis* L.). *J Korean Agric Chem Soc* 35: 272-275, 1992.
 14. KFDA. Guideline of standard of functional ingredient for health functional food development. Korea Food & Drug Administration. pp 53-59, 2008.
 15. Kim, D.H., Yang, B.S. Molecular mechanisms underlying the link of obesity to chronic diseases. *Kor J Oriental Association for Study of Obesity* 15: 121-128, 2006.
 16. Frayn, K.N., Karpe, F., Fiedding, B.A., Macdonald, I.A., Coppack, S.W. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 875-888, 2003.
 17. Levy, R.I. Cholesterol, lipoproteins, apoproteins, and heart disease: present status and future prospects. *Clin Chem* 27: 653-662, 1981.
 18. Kim, H.J., Chio, S.H., Chum, B.G., Kim, D.H. The role of adipose tissue vasculature in energy balance. *J Korean Soc Pediatr Endocrinol* 16: 139-156, 2011.
 19. Hang, J.Y., Choi, H.J. Effects of *Artemisia lwayomogi* oligosaccharide on the blood lipids, abdominal adipose tissues, and leptin levels in the obese rats. *Korean J Nutr* 36: 437-445, 2006.
 20. Niiho, Y., Yamazaki, T., Nakajima, T., Itoh, H., Takeshita, T., Kinjo, J., Nohara, T. Pharmacological studies on *peruariae flos*. II. The effects of *peruariae flos* on alcohol-induced unusual metabolism and experimental liver injury in mice. *J Pharm Soc Japan* 110: 604-611, 1990.
 21. Kim, C.O., Kang, S.A. Effect of high fat and high carbohydrate diet on serum leptin and lipid concentration in rats. *Korean J Nutr* 34: 123-131, 2001.
 22. Sung, I.S., Park, E.M., Lee, M.K., Jang, J.Y., Cho, S.Y. Effect of acorn extracts on the antioxidative enzyme system. *J Korean Soc Food Sci Nut* 26: 494-500, 1997.