(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0004089
(43) 공개일자 2021년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/15 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/15 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0079957
(22) 출원일자 2019년07월03일
심사청구일자 2019년07월03일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김대옥
경기도 용인시 수지구 수지로113번길 16, 103동 203호 (성복동, 강남빌리지)
김관중
서울특별시 양천구 중앙로29길 61, 104동 902호(신월동, 신정뉴타운롯데캐슬)
한완택
경기도 용인시 수지구 성복1로 157, 110동 903호 (성복동, 버들치마을경남아너스빌1차)
(74) 대리인
위병갑

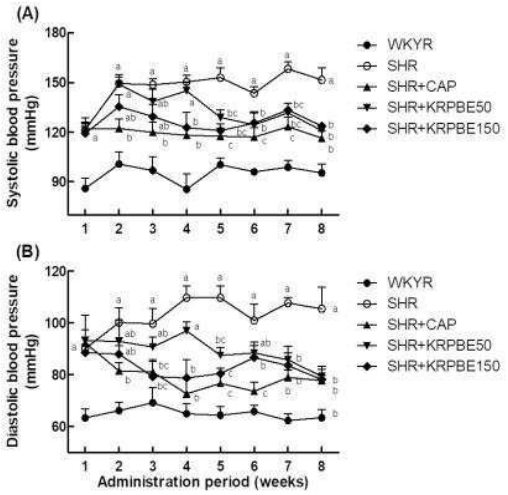
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **소나무 껍질 추출물을 포함하는 고혈압의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 소나무 껍질 추출물을 포함하는 고혈압의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 소나무 껍질 추출물은 ACE 활성을 감소시키고, 안지오텐신 II의 함량을 감소시키며, MDA 함량을 감소시킬 수 있어 혈압상승을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라, 인체에 대한 안전성이 높으므로 고혈압의 예방 및 치료용 의약품 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 9/12 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

소나무 껍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 소나무는 국내산 적송(Pinus densiflora)을 사용한 것을 특징으로 하는, 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매에 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는, 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 ACE 활성을 억제 또는 감소시키고, 안지오텐신 II의 함량을 억제 또는 감소시키며, MDA(malondialdehyde) 함량을 억제 또는 감소시키는 것을 특징으로 하는, 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

소나무 껍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 고혈압 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 소나무는 국내산 적송(Pinus densiflora)을 사용한 것을 특징으로 하는, 고혈압 예방 및 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 소나무 껍질 추출물을 포함하는 고혈압의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항산화제는 세포막에서 다가 불포화 지방산을 공격하여 지질 과산화를 일으키는 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)이나 활성질소종 (reactive nitrogen species; RNS)을 소거하는데 이들이 생체 내에서 정상적으로 소거되지 않았을 때 유리기로 인한 산화적 스트레스(oxidative stress) 및 질산화적 스트레스(nitrosative stress)가 가해져 여러 조직에서 세포막의 변화, 효소활성의 감소, DNA 손상 및 돌연변이 생성에 영향을 주게 되며 암, 아테롬성경화증, 염증반응, 관절염, 알츠하이머병, 백내장, 당뇨병, 천식, 허혈 등의 만성 퇴행성 질환을 유발하게 된다. 특히, 이 중에서 순환기계 질환은 미국과 서유럽에서 사망 원인의 제 1위를 차지할 만큼 사망의 주요인이 되고 있다.

[0003] 한편, 고혈압은 주로 RAS(renin-angiotensin system)에 의한 생리학적 기전으로 설명되고 있다. 안지오텐신 Ⅰ(Angiotensin Ⅰ)은 혈압상승에 중요한 역할을 하는 안지오텐신 Ⅱ(angiotensin Ⅱ (ang Ⅱ))의 전구체 역할을

하며 안지오텐신 전환 효소(angiotensin converting enzyme, ACE)에 의해 대부분 Ang Ⅱ로 전환된다.

[0004] 특히, Ang Ⅱ는 안지오텐신 Ⅱ-타입 1-수용체(angiotensin Ⅱ-type 1 (AT1)-receptor)와 결합하여 혈관수축과 알도스테론의 분비를 증가시킴으로써 직접적으로 혈압상승에 관여하는 물질이며, 슈퍼옥사이드 이온(superoixe anion), 과산화 수소(hydrogen peroxide), 수산기 라디칼(hydroxyl radical), 퍼록시니트리트(peroxynitrite)와 같은 ROS 및 RNOS의 생성을 증가시켜 내피세포의 기능 기상 및 LDL 산화를 촉진하여 혈관의 염증반응을 유도한다. 또한 Ang Ⅱ는 NADH/NADPH 산화효소의 작용을 통해 내피세포 내 산화적 스트레스를 야기하며 SHR(spontaneously hypertensive rat)에서 이 효소의 자극은 혈관 슈퍼옥사이드 이온의 생성을 유도하여 혈관평활근 세포의 비대 및 사멸과 같은 내피세포의 기능 이상을 초래함으로써 NO의 생체 이용률을 감소시킨다. 이러한 RAS 기전 및 ROS 관련 기전에 항산화제가 작용하게 되면 Ang Ⅱ와 AT1-수용체의 작용을 방해하며 항산화효소계의 활성을 증가시킴으로써 세포 손상을 감소시키고 NO 생성을 증가시켜 혈관확장을 통해 심혈관계질환의 위험을 감소시키게 된다. 즉, 항산화 작용이 큰 물질이 항고혈압 효과를 가질 수 있을 것으로 여겨진다(Brewster, U.C., Setaro, J.F., Perazella, M.A., Am. J. Med. Sci., 326, pp15-24, 2003; Tummala, P.E., Chen, X.L., Sundell, C.L., Circulation, 100, pp1223-1229, 1999; Siragy, H.M., Am. J. Hypertens., 13, pp32S-37S, 2001).

[0005] 오늘날 고혈압 치료제로 널리 사용되고 있는 약물로는 에날라프릴(enalapril), 캅토프릴(captopril), 조페노프릴(zofenopril), 리시노프릴(lisinopril) 같은 ACE 저해제와 로사르탄(losartan), 칸다사르탄(candasartan), 일베사르탄(irbesartan) 등과 같은 AT1-수용체 차단제가 있다(Joshua, M.T., Robert, W.S., The American Journal of Medicine., 114, pp588-598, 2003; Ondetti, M.A., Rubin, B., Cushman, D.W., Science., 196, pp441, 1997). 그러나 이러한 약제들은 미각이상, 백혈구 감소, 혈관부종, 간기능이상 및 마른 기침 등의 부작용이 많다.

[0006] 그러므로 항산화능이 우수하고 인체에 무해한 천연 항산화제를 이용한 고혈압에 의한 질환의 예방 및 치료용 조성물의 개발이 절실히 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1819606호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 소나무 껍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 소나무 껍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 고혈압 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 소나무 껍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 소나무는 국내산 적송(Pinus densiflora)을 사용할 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매에 가용한 추출물일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 ACE 활성을 억제 또는 감소시키고, 안지오텐신 II의 함량을 억제 또는 감소시키며, MDA 함량을 억제 또는 감소시킬 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 소나무 껍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 고혈압 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 소나무는 국내산 적송(Pinus densiflora)을 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 소나무 껍질 추출물은 ACE 활성을 감소시키고, 안지오텐신 II의 함량을 감소시키며, MDA 함량을 감소시킬 수 있어 혈압상승을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라, 인체에 대한 안전성이 높으므로 고혈압의 예방 및 치료용 의약품 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 처리군 SHR과 대조군 WKYR의 혈압을 8주간 측정한 결과이다.

도 2는 7주간의 강제경구투여 및 혈압 측정이 끝난 쥐들에게서 적출한 폐(A), 혈액(B), 신장(C)의 ACE 활성을 나타낸 결과이다.

도 3은 7주간의 강제경구투여 및 혈압 측정이 끝난 쥐들에게서 적출한 폐(A), 혈액(B), 신장(C)의 angiotensin II 함량을 나타낸 결과이다.

도 4는 7주간의 강제경구투여 및 혈압 측정이 끝난 쥐들에게서 적출한 폐(A), 혈액(B), 신장(C)의 지질 과산화 지표인 MDA를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 소나무 껍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에서 정의되는 소나무는 이에 제하는 것은 아니지만, 가장 바람직하게는 국내산 적송(Pinus densiflora)일 수 있다.

[0020] 본원에서 정의되는 추출물은 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매, 더욱 바람직하게는 물 또는 70% 에탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[0021] 이하, 본 발명의 추출물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명의 추출물은 소나무의 껍질을 건조하고 마쇄하여 그 중량의 약 2 내지 40, 바람직하게는 5 내지 15배 부피의 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매, 바람직하게는 에탄올로 10 내지 150° C, 바람직하게는 20 내지 70° C의 추출 온도에서 0.5 내지 24시간, 바람직하게는 1 내지 7시간 동안 열수추출, 환류냉각 추출, 초음파 추출 등의 추출방법, 바람직하게는 열수 추출의 추출방법으로 1 내지 10회, 바람직하게는 1 내지 5회 반복하여 추출물을 수득한 후, 감압여과하고 동결 건조하여 본 발명의 소나무 껍질 추출물을 수득할 수 있다.

[0023] 본 발명은 상기의 제조공정으로 얻어진 소나무 껍질 추출물을 유효성분으로 함유하는 고혈압의 예방 및 치료를 위한 약학조성물을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명의 소나무 껍질 추출물은 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.

[0025] 본 발명의 고혈압 예방 및 치료용 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 50중량%로 포함한다.

[0026] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈,

[0028] 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는

상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0031] 본 발명은 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 고혈압의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0032] 소나무 껍질 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.

[0033] 또한, 고혈압 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 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 있다.

[0034] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0035] 상기 외에 본 발명의 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 추출물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0037] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학 또는 식품조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

제제예 1. 식품의 제조

소나무 껍질 추출물 ·····50 mg

액상과당 ·····50 g

비타민 C ·····100 mg

비타민 B2 ·····1.4 mg

민트향 ·····50 mg

정제수 ·····300 mL

[0039]

[0040] 상기의 성분을 계량하여 정제수에 혼합하여 용해한 후 여과하여 불용성 물질을 제거한 후 유리병에 충진한 후 95℃에서 10분간 가열하여 식품을 제조하였다.

제제예 2. 정제의 제조

소나무 껍질 추출물 ·····50 mg

락토스 ·····45 mg

미세결정성 셀룰로스 ····· 100 mg

스테아린산 마그네슘 ····· 4 mg

이산화규소 ·····1 mg

[0042]

[0043] 상기의 성분들을 혼합하고 통상적인 정제의 제조방법에 따라 과립을 형성한 후 정제를 제조하였다.

제제예 3. 캡슐의 제조

소나무 껍질 추출물 ·····50 mg

락토스 ·····45 mg

미세결정성 셀룰로스 ····· 100 mg

스테아린산 마그네슘 ····· 4 mg

이산화규소 ·····1 mg

[0045]

[0046] 상기의 성분들을 혼합하고 통상적인 캡슐의 제조방법에 따라 캡슐제를 제조하였다.

제제예 4. 액제의 제조

[0048]

소나무 껍질 추출물	50 mg
액상과당	50 g
민트향	50 mg

[0049] 정제수를 가하여 전체가 300 mL가 되도록 액제를 제조하였다.

[0051] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0052]

[0053] **<실시예 1>**

[0054] **실험재료 및 실험방법**

[0056] **<1-1> 본 발명의 적송 껍질 추출물 제조방법**

[0057] 국내 강원도 삼척지방에서 자생하고 있는 30년생 적송(Pinus densiflora Sieb & Zucc.)에서 얻은 수피로부터 최외각층을 제거한 후 파쇄기와 분쇄기를 사용하여 수피분말(30메쉬)을 얻었다. 1.0Kg의 수피분말에 60% 에탄올이 함유된 천연 주정용액 8.0Kg 을 혼합한 후 50℃로 가열한 진탕항온수조에서 3시간동안 추출한 후 여과하였다. 수피 여과박에 60% 에탄올과 40% 물로 구성된 주정용액 4.0Kg을 가한 후 50℃로 가열한 진탕항온수조에서 1시간 동안 추출한 후 여과하여 적송 껍질 추출물을 제조하였다.

[0059] **<1-2> 적송 껍질 추출물에 의한 고혈압 예방 및 개선 평가 방법**

[0060] 적송 껍질 추출물에 의한 고혈압 예방 및 개선할 수 있는지 확인하기 위해, 상기 실시예 <1-1>의 추출물을 Wistar-Kyoto 쥐(Wistar-Kyoto rat; WKYR)와 본태성 고혈압 쥐(spontaneous hypertension rat; SHR)에 투여하여 혈압의 변화를 측정하였다.

[0061] 6주령의 수컷 WKYR과 SHR은 23℃, 상대습도 56%, 12시간의 명/암이 자동적으로 유지되는 환경에서 일주일간 적응기간을 거쳤다. 또한 실험은 쥐들이 자유롭게 물과 사료를 섭취할 수 있는 환경에서 진행되었다. 적응기간 이후, 물(정상혈압군, 대조군)과 양성대조군(captopril) 그리고 적송 껍질 추출물 투여군(50, 150 mg/kg/day)으로 나누어 8주간 매일 오전 10시에 강제 경구 투여를 진행하였다. 혈압의 측정은 매주 금요일 같은 시간에 CODA® tail-cuff blood pressure system (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA)을 통해 측정되었다. 쥐들은 검은 아크릴 재질의 고정틀에 들어가 15분의 안정기간을 가지고, 이후 꼬리의 혈압을 측정하였다.

[0063] **<1-3> 국산 적송 껍질 추출물에 의한 혈압 감소 기작 확인 방법**

[0065] **<1-3-1> 혈액 채취 및 장기 적출**

[0066] 7주간의 물, 캅토프릴(captopril), 적송 껍질 추출물 투여와 혈압 측정이 끝난 후, 쥐들을 에테르(ether) 가스로 마취시킨 후, 빠르게 혈액을 채취하고 장기를 적출했다. 혈액은 응고 방지를 위해 에틸렌디아민사아세트산 튜브(ethylenediaminetetraacetic acid tube)에 모아 18,403 × g로 20분간 4℃에서 원심분리 하여 상층액을

모았다(PK121R; ALC International S.R.L., Cologno Monzese, Italy).

[0067] 이후 실험 전까지 −80℃의 환경에서 보관하였다. 적출한 폐와 신장은 용해 완충제와 함께 균질화한 후, 4℃의 환경에서 90분간 진탕을 통해 단백질을 추출하였다. 이후 18,403 × g로 20분간 4℃에서 원심분리 한 뒤, 상층액을 모아 실험 전까지 −80℃의 환경에서 보관하였다.

[0069] **<1-3-2> ACE 활성 측정**

[0070] ACE 활성은 전처리 된 조직의 상층액, 혈액을 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 5.7 mM의 hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hippuryl-His-Leu; HHL)를 분주하여 15분간 37℃에서 배양하였다. 이후 3 μL의 조직, 혈액 상층액 혹은 ACE 활성 표준물질 L-histidyl-L-leucine (His-Leu; HL)을 분주한 후 25분간 37℃에서 배양하였다. 이후 HHL의 활성을 없애기 위해 0.28 M 수산화나트륨 177 μL을 첨가하였고, 바로 형광반응을 위해 20 mg/mL의 o-phthaldialdehyde 15 μL를 첨가한 후 상온에서 10분간 진탕배양 하였다. 이후 형광반응을 멈추기 위해 3 M의 염산 25 μL를 첨가하였고 이후 즉시 마이크로플레이트 리더기(Victor X3; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 통하여 excitation 360 nm, emission 485 nm에서 형광값을 측정하였다.

[0071] 1 mU의 ACE은 1 nM의 HL/min으로 계산되어 ACE 활성을 계산하였다.

[0073] **<1-3-3> Angiotensin II 함량 측정**

[0074] 전처리 된 조직 상층액, 혈액의 angiotensin II 함량은 시중에 판매되는 angiotensin II ELISA kit를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 진행하였다.

[0076] **<1-3-4> MDA 함량 측정**

[0077] 조직이나 혈액의 지질 과산화 지표인 MDA는 다음과 같은 과정으로 측정하였다. 100 μL의 조직 상층액이나 혈액은 단백질 침전을 위해 200 μL의 10% (v/v) 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)과 섞어 10분간 얼음에서 배양하였다.

[0078] 이후 상층액을 0.67% (v/v) 2-thiobarbituric acid 200 μL와 100℃에서 10분간 반응시켰다. 이후 반응물을 식힌 뒤, 96-well plate에 옮겨 마이크로플레이트 리더기(Victor X3; PerkinElmer)를 통하여 531 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 1,1,3,3-tetramethoxypropane 표준곡선을 통하여 계산하였다.

[0080] **<실시예 2>**

[0081] **국산 적송 껍질 추출물의 고혈압 강하 효과**

[0082] 본 발명의 도 1은 본태성 고혈압 쥐(spontaneous hypertension rat; SHR)와 대조군 Wistar-Kyoto 쥐(Wistar-Kyoto rat; WKYR)의 혈압을 8주간 측정한 결과이다.

[0083] SHR은 물과 양성 대조군인 ACE 저해제 (captopril) 15 mg/kg/day, 그리고 국내산 적송 껍질 추출물(Korean red pine bark extract; KRPBE) 50, 150 mg/kg/day를 강제 경구 투여한 4개의 군으로 나누었다. (A)는 수축기혈압(systolic blood pressure), (B)는 이완기혈압(diastolic blood pressure)을 나타내는데, 적송 껍질 추출물의 투여에 의해 처리군 SHR의 혈압이 공통적으로 낮아지는 것을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

[0084] 따라서, 상기 결과는 적송 껍질 추출물의 투여가 고혈압을 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 나타낸다.

[0086] **<실시예 3>**

[0087] **국산 적송 껍질 추출물의 ACE 활성 감소 효과**

[0088] 도 2는 7주간의 강제경구투여 및 혈압 측정이 끝난 쥐들에게서 적출한 폐(A), 혈액(B), 신장(C)의 ACE 활성을 나타낸 결과이다.

[0089] (A)와 (B)에서 정상혈압군에 비해 대조군이 유의적으로 높은 ACE 활성을 나타내었다. 하지만 양성대조군과 적송 껍질 추출물을 투여한 SHR은 그 ACE 활성이 통계적으로 유의하게 감소되는 것이 확인되었다. 하지만 (C)에서는 적송 껍질 추출물의 투여에 의한 ACE 활성 감소를 볼 수 없었다.

[0090] 이러한 결과는 적송 껍질 추출물의 투여가 폐와 혈액에서 ACE 활성을 감소시켜 고혈압을 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 나타낸다.

[0092] **<실시예 4>**

[0093] **국산 적송 껍질 추출물의 Angiotensin II 함량 감소 효과**

[0094] 도 3은 7주간의 강제경구투여 및 혈압 측정이 끝난 쥐들에게서 적출한 폐(A), 혈액(B), 신장(C)의 angiotensin II 함량을 나타낸 결과이다.

[0095] (A), (B), (C)에서 공통적으로 정상 혈압군에 비해 대조군이 유의적으로 높은 angiotensin II 함량을 가짐을 확인하였고, 양성대조군에 적송 껍질 추출물을 투여한 경우 angiotensin II 함량이 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0096] 이러한 결과는 적송 껍질 추출물의 투여가 폐, 혈액, 신장에서 angiotensin II 함량을 감소시켜 고혈압을 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 나타낸다.

[0098] **<실시예 5>**

[0099] **국산 적송 껍질 추출물의 MDA 함량 감소 효과**

[0100] 도 4는 7주간의 강제경구투여 및 혈압 측정이 끝난 쥐들에게서 적출한 폐(A), 혈액(B), 신장(C)의 지질 과산화 지표인 MDA를 측정한 결과이다.

[0101] (A)에서 정상혈압군 WKYR에 비해 대조군 SHR에서 높은 MDA 함량을 보였다. 적송 껍질 추출물은 두 농도 모두에서 MDA 함량을 감소시키는 결과를 보였다. (B)에서는 정상혈압군 WKYR이 대조군 SHR과 유의적으로 MDA 차이를 보이지 않았지만, 양성대조군과 적송 껍질 추출물을 투여한 군들에서는 대조군에 비해 유의적으로 낮은 MDA 함량을 확인 할 수 있었다. (C)에서는 대조군이 정상혈압군에 비해 유의적으로 높은 MDA 함량을 보였고, 양성대조군에 국산 적송 껍질 추출물을 투여한 군은 대조군에 비해 유의적으로 낮은 MDA 함량을 보였다.

[0102] 이러한 결과는 적송 껍질 추출물의 투여가 폐, 혈액, 신장에서 MDA 함량을 낮추는 항산화 효과가 있고, 이로 인해 레닌-안지오텐신 시스템과 활성산소간의 positive feedback 작용이 조절되어 고혈압을 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 나타낸다.

[0104] **<실시예 6>**

[0105] **국산 적송 껍질 추출물과 다른 나라 소나무 껍질 추출물의 항고혈압 활성 비교**

[0106] 본 발명 국산 적송 껍질 추출물의 항고혈압 활성을 확인하기 위하여, 다른 나라(프랑스 지역의 해송, 핀란드 지역의 적송) 소나무의 껍질 추출물을 수득하여 항고혈압 활성을 비교하였다.

[표 1] 국산 적송 껍질 추출물과 다른 나라 소나무 껍질 추출물의 항고혈압 활성 비교 결과

	국산 적송 껍질 추출물	프랑스 해송 껍질 추출물	필란드 적송 껍질 추출물
투여용량	50mg/kg/day	50mg/kg/day	50mg/kg/day
수축기(systolic) 혈압 감소량(mmHg)	27	20	19
수축기 혈압 감소량(%)	17	10	8
이완기(diastolic) 혈압 감소량 (mmHg)	22	21	24
이완기 혈압 감소량(%)	20	20	22

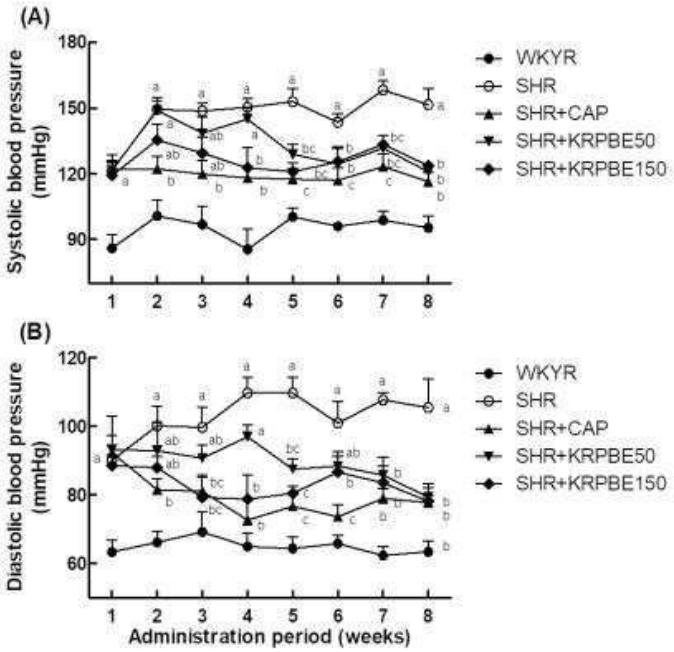
[0108]

[0110] 그 결과, 동일용량을 투여한 실험동물에서 국산, 프랑스산, 핀란드산의 소나무 껍질 추출물을 처리한 이완기 혈압 감소량에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 수축기 혈압 감소량의 경우 프랑스 해송 껍질 추출물의 경우 10% 감소량을 보였고, 핀란드 적송 껍질 추출물의 경우 8%의 감소량을 보였으나, 본 발명의 국산 적송 껍질 추출물의 경우 17% 감소량을 보여 프랑스산(해송) 및 핀란드산(적송)의 소나무 껍질 추출물 대비 월등히 높은 항고혈압 활성을 보임을 알 수 있었다.

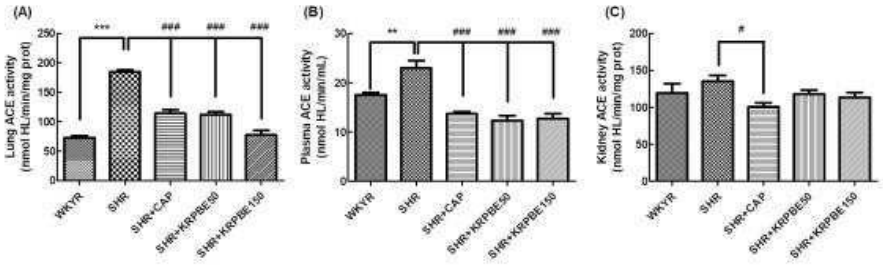
[0112] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

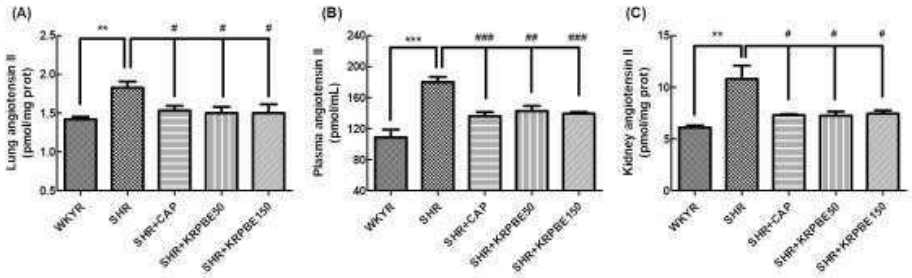
도면1



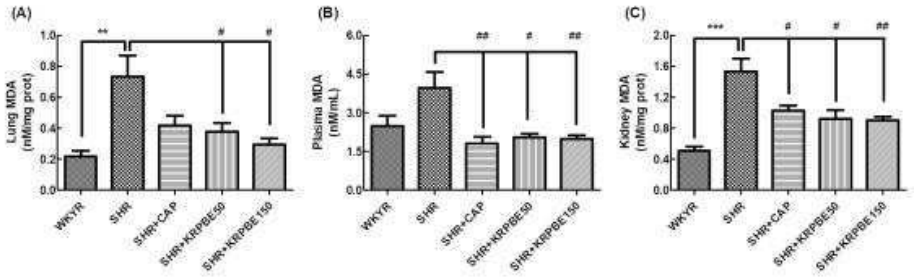
도면2



도면3



도면4


(A)
Lung MDA (nM/mg prot)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
#
#
WKYR
SHR
SHR+CAP
SHR+KRPBE50
SHR+KRPBE150
(B)
Plasma MDA (nM/mL)
6.0
4.5
3.0
1.5
0.0
##
#
##
WKYR
SHR
SHR+CAP
SHR+KRPBE50
SHR+KRPBE150
(C)
Kidney MDA (nM/mg prot)
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
***
#
#
##
WKYR
SHR
SHR+CAP
SHR+KRPBE50
SHR+KRPBE150