



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년02월19일
(11) 등록번호 10-0804722
(24) 등록일자 2008년02월12일

(51) Int. Cl.

A61K 36/15 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0138272

(22) 출원일자 2006년12월29일

심사청구일자 2006년12월29일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020030068640 A

KR1020060099192 A

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

김상겸

서울 영등포구 양평동 삼호아파트 1동 2307호

박창식

충남 공주시 신관동 대아아이투빌아파트 105-401

(74) 대리인

신동인

전체 청구항 수 : 총 2 항

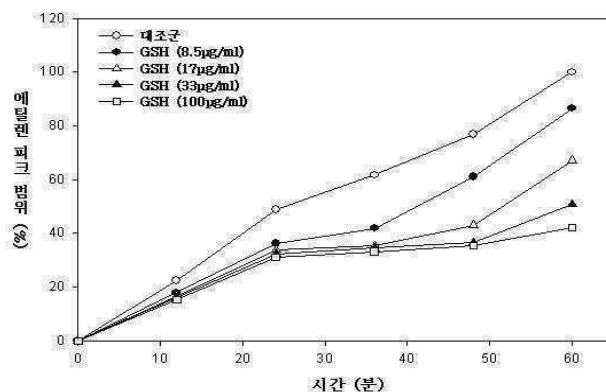
심사관 : 이선화

(54) 항산화 활성을 갖는 술잎 또는 이의 추출물을 함유하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 항산화 활성을 갖는 술잎 또는 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화제, 동물사료 첨가제 및 이를 포함하는 사료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 술잎 및 이의 추출물은 항산화 효과를 가지고 있어 인간에게는 육질 개선, 이취 감소 및 각종 성인병 예방의 이익을, 가축에게는 소화력 증진, 사육기간 단축, 사료비 절감 및 면역력 증대로 인한 각종 질병 예방의 이익을 주므로 농가소득 증대에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

항산화 활성을 갖는 적송(red pine tree; *Pinus densiflora*)의 잎 또는 이의 50 내지 80% 메탄을 추출물을 유효성분으로 함유하는 동물사료 첨가제.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 4항의 동물사료 첨가제를 포함하는 동물 사료용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<8> 본 발명은 항산화 활성을 나타내는 솔잎 또는 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화제, 동물사료 첨가제 및 이를 포함하는 사료용 조성물에 관한 것이다.

<9> 산소와 관련된 인체 내 산화성물질을 활성산소종(ROS: reactive oxygen species)과 활성질소종(RNS: reactive nitrogen species)이라고 하는데 이러한 ROS 및 RNS의 종류로는 슈퍼옥사이드(superoxide), 히드록실(hydroxyl), 퍼옥실(peroxyl), 알콕실(alkoxyl) 및 하이드로퍼옥실(hydroperoxyl)과 같은 자유라디칼(유리기, free radical)과 히드로젠퍼옥사이드(hydrogenperoxide), 히포클로로스산(hypochlorous acid), 오존(ozone), 일중항 산소(singlet oxygen), 및 과산화질산염(peroxynitrite) 등과 같은 비(非)자유라디칼(비유리기, non free radical)이 있다. 이 중에서 반응성이 강하여 직접적인 독성을 유발하는 것은 하이드로퍼옥실, 퍼옥실 및 과산화질산염 등이다(Bayir H. et al., *Crit Care Med.*, 33(12 Suppl), pp498-501, 2005; Niles et al., *Nitric Oxide*, 14, pp109-121, 2006).

<10> 산화성물질들은 다양한 생물체의 산화·환원 반응에서 생성되며, 식용유지의 변질 또는 여러 생체물질(지질, 단백질, 핵산 및 탄수화물)에 산화적인 손상을 유발할 수 있으며 여러 단계를 거치게 되면서 결과적으로 세포에 손상을 유발할 수 있다(Yen GC. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 43, pp27-32, 1995). 생체막 구성성분인 인지질의 불포화지방산은 활성산소종과 같은 자유라디칼에 의해 과산화 반응이 개시되며 또한 연쇄적으로 진행된다. 그러므로 자유라디칼에 의한 과산화반응은 세포막의 투과성을 향진시킬 뿐 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유도하여 발암과정에도 관여한다. 라디칼 작용은 산화적 스트레스와 관련된 질환인 아토피성 질환, 암, 고혈압, 심근경색, 동맥경화, 류머티스, 백내장 및 파킨슨씨병 등 여러 가지 만성질환의 진행에 많은 영향을 주며(De Souza LC. et al., *Bioorg. Med. Cehm. Lett.*, 14, pp5859-5861, 2004), 면역계 기능을 약화시키는 요인으로 작용될 수 있다(Pike J. et al., *Int. J. Vitam.*

Nutr. Res., 65, pp117-120, 1995).

<11> 생명체가 반복적으로 산화적 스트레스에 노출될 경우 세포는 이에 대응하기 위해 항산화 활성을 갖는 효소나 물질의 생성을 증가시켜 생체를 보호하게 된다. 이런 생체의 보호기작을 항산화 체계(antioxidant defense system)라하며 크게 항산화 효소 및 저분자의 항산화 물질로 구분된다. 항산화 효소 및 저분자의 항산화 물질은 상호 보완적으로 작용하여 생체에서 생성되는 산화성물질을 무독화시킨다. 특히 글루타치온(GSH, glutathione)은 대표적인 저분자의 항산화 물질로 직접적으로 산화성물질을 환원시킬 뿐만 아니라 글루타치온 S-전달효소(glutathione S-transferase) 및 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase)의 기질로 작용하여 친전자성 물질을 무독화시킨다(Estrela et al., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 43(2), pp143-181, 2006).

<12> 최근 천연물 추출물 등에서 총체적인 항산화활성을 측정하기 위한 다양한 시도가 진행되고 있다(Prior RL. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 53, pp4290-4302, 2005). 시료의 총 항산화 활성측정은 활성산소종에 의한 독성에 대한 저항성을 판단하는데 유효하며 이 목적을 위해 몇 가지 방법이 개발된 바 있다(Prior RL. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 53, pp4290-4302, 2005). 1980년대 중반에 자유기 생성물질 및 항산화물질을 함유한 실험계에서 최대산소소비에 요하는 시간을 측정하여, 그 결과를 수용성 비타민 E 유도체인 트롤록스(Trolox)로 측정된 시간과 비교하는 총 자유기 산화방지능력법(TRAP, total radical trapping antioxidant parameter)이 개발되었다(DeLange and Glazer, *Anal Biochem.*, 28, pp300-306, 1989). 그 후 라디칼이 형광물질에 주는 화학적 손상에 의한 형광의 감소로 항산화 활성을 측정하는 방법이 제시되었다(Tanaka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, pp2530-2536, 2001). 라디칼에 의한 형광물질의 형광감소속도는 일정하지만 항산화물질이 존재 시에는 일시적인 지연이 관찰된 후 형광의 감소가 신속하게 일어난다. 따라서 시료와 대조군의 곡선하면적(AUC, area under the curve)의 차이를 측정하는 산소유리기 흡수율(ORAC, Oxygen Radical Absorbance Capacity) 측정법 및 항산화 물질이 존재할 때 형광물질의 보호시간, 즉 유도기(lag-phase)를 측정하는 방법 등이 개발되었다(Ghiselli et al., *Free Radical Biol. Med.*, 18, pp29-36, 1995). 그러나 이들 방법은 모두 생체내에서 발생하는 라디칼이 아닌 인공적인 라디칼을 이용함으로써 생체에서의 항산화 활성을 평가하는데 한계를 가진다(Prior RL. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 53, pp4290-4302, 2005).

<13> 레굴리(Regoli)와 윈스턴(Winston)은 생체내 산화성물질과 반응하여 에틸렌으로 산화되는 α -아미노- γ -메티올부티르산(KMBA, α -keto- γ -methiolbutyric acid)를 사용하여 생체 조직과 천연물의 항산화 활성을 측정하는 방법을 개발하였다(Winston et al., *Free Radical Biol. Med.*, Feb., 24(3), pp480-493, 1998; Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Apr., 15, 156(2), pp96-105, 1999). 에틸렌은 밀폐된 반응용기 내에서 공기 시료를 취해 가스크로마토그래피로 정량할 수 있다. 이 방법의 장점은 활용성에 있는데 KMBA는 다양한 산화성 물질인 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical), 퍼옥실 라디칼(peroxyl radical), 과산화질산염(peroxynitrite) 및 차아염소산(hypochlorous acid) 등과 반응하여 에틸렌을 생성하므로 항산화활성이 높은 조직 및 혈액 시료에서는 에틸렌의 발생이 저해된다. 이 방법에서는 KMBA와 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical), 퍼옥실 라디칼(peroxyl radical) 및 과산화질산염(peroxynitrite) 등과의 반응에 의해 발생하는 에틸렌의 농도를 반응시간의 변화에 따라 측정하여 곡선하면적(AUC, area under the curve)을 구하고 대조군 및 투여군의 AUC 비율로부터 TOSC를 산출한다. 따라서 단일 반응시점에서만 측정되는 방법이 가지고 있는 오차를 보정할 수 있는 재현성이 높고 정확한 방법이다. 시료로부터 측정된 TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 이 측정값은 기기의 감도나 사용시약 및 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다. 더욱이 생체에서 실제로 생성되는 산화성물질에 대한 항산화 활성을 평가함으로써 생물체의 적용 가능성이 높은 방법이다(Ghiselli A. et al., *Free Radical Biol. Med.*, 18, pp29-36, 1995).

<14> 자유라디칼로부터 인체를 보호하는 협동적인 방어시스템은 산화를 저해시키는 영양소와 효소를 가지고 있다 (Halliwell B. et al., *Annu. Rev. Nutr.*, 16, pp33-50, 1996). 산화적인 스트레스로부터 인체를 보호하는 효과적인 방법 중 하나는 항산화 수준을 증가시키는 것이다 (De Souza LC. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, pp5859-5861, 2004). 따라서 산화적 손상으로부터 예방하기 위한 대체 물질의 항산화적인 평가는 매우 활발하게 연구되고 있다.

<15> 항산화제는 산소를 제거하거나 흡수하는 것이 아니라 자유라디칼과 반응함으로써 특정 비타민류와 필수 아미노산 등의 손실을 최소화 하거나, 유지 제품의 산패를 지연 또는 방지하는 목적으로 사용된다. 식품 또는 의약품 등에 많이 사용되는 합성 항산화제로는 부틸화 하이드록시아니솔(BHA, Butylated hydroxyanisole), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT, Butylated hydroxytoluene), 프로필 갈레이트(PG, Propyl galate) 및 터셔리부틸 하이드로퀴논(TBHQ, Teritiarybutyl hydroquinone) 등이 있으나, 이들을 실험동물에 고농도로 투여할 경우에는 간 비대증이 유발되거나 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 부틸화 하이드록시톨루엔은 여러 연구 결과

를 통하여 실험동물의 간에서 마이크로솜 효소 활성(microsomal enzyme activity)을 증가시킨다는 것이 알려지면서, 이들 페놀계 합성 항산화제의 안전성에 대하여 논란이 제기되어 현재에는 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다(Brannen *et al.*, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 52, pp59-63, 1975 ; Ito N. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, p343, 1983 ; Chan KM. *et al.*, *J. Food Sci.*, 58, pp1-4, 1993).

<16> 이에 따라 항산화 효과가 높으면서 안전하고 경제적인 식물기원의 천연 항산화제를 개발하고자 하는 많은 연구가 기대 속에 이루어지고 있다(Larson RA. *et al.*, *Phytochemistry*, 27, pp969-978, 1988). 최근 천연물을 대상으로 한 연구가 활발히 수행되면서 천연물에 함유되어 있는 2차 대사산물이 생리활성물질로서 주요 관심사가 되고 있으며 특히, 항산화성 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(中谷延二, *日本食品工業學會誌*, 37, p569, 1990). 생리활성물질은 매우 적은 양으로도 현저한 활성을 나타내는 고부가가치 물질로서 많은 종류가 유용하게 쓰이고 있으며, 새로운 물질들에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다(條原和毅, *食品と開発*, 27, p29, 1992; Kang SS. *et al.*, *Natural product science. Seoul Univ. Publishers*, Seoul, p71, 1988).

<17> 현재까지 알려진 천연 항산화 물질로는 토코페롤(tocopherol)류, 플라보노이드(flavonoid)류, 고시폴(gossypol), 세사몰(sesamol), 오리자놀(oryzanol) 및 비타민 C 등을 들 수 있다(Huson B. *et al.*, *Food Chem.*, 19, pp537-541, 1987; Frankel, E.N. *et al.*, *Food Chem.*, 57, p51, 1996; Giese J. *et al.*, *Food Technol.*, 5, pp73-81, 1996; Pszczola DE. *et al.*, *Food Tech.*, 55, pp51-59, 2001). 이 중 토코페롤(tocopherol)과 L-아스코르브산(L-ascorbic acid)이 천연 항산화제로 선호되고 있는데, 그 중 토코페롤은 안전성이 높으나 단독으로는 산화반응 저지 능력이 낮으며(Halliwell B. *et al.*, *FASEB J.*, 2, pp2867-2870, 1988) 가격이 비싸다는 단점이 있다.

<18> 소나무는 피너스(Pinus)속으로 세계에 약 80-90종이 있으나 이들 중 피너스 팔루스트리스 밀러(P. palustris Miller : 북미), 피너스 피나스터에이톤(P. pinaster Aiton : 프랑스), 피너스 실베스트리스(P. sylvestris L. : 유럽전역), 피너스 라리시드 포이렛(P. laricid Poiret : 오스트리아), 피너스 롱기폴리아 록스버그(P. longifolia Roeburgh : 인도), 피너스 덴시플로라 시드(P. densiflora Sied. et Zucc. : 한국, 일본) 및 피너스 툰베리팔라토레(P. thunbergii Palatone : 해송, 일본)등에서 채취한 테르펜 등이 주로 산업에 이용되고 있다.

<19> 솔잎의 주요성분은 테르펜틴 오일(Terpentine oil), 시네올(Cineole), 살리니그린(Salinigrin), 코니페린(Coniferin), 피-사이멘(P-Cymen), 덴시피마릭산(Densipimaric acid) 및 레텐(Retene) 등과 엽록소, 단백질, 노지방, 인, 철분, 효소, 미네랄, 지용성 비타민 A 및 비타민 C 등이며, 주요성분은 종과 채취한 계절에 따라서 다소 차이가 있다.

<20> 솔잎에서 얻은 정유에는 알파-피넨(α -Pinene), 베타-피넨(β -Pinene), 캄페네(camphene), 펠란드렌(phellandrene), 보르네올(borneol), 보르닐아세테이트(bornylacetate), 카리오필렌(caryophyllene), 카디넨 디테르펜(cadinene diterpene), 세스퀴테르펜(sesquiterpen), 세스퀴테르펜알콜(sesquiterpenalcohol), 세틸알콜(cerylalcohol), 밀납에는 주니퍼산(juniperic acid), 사비니산(sabinic acid), 헥사데칸디올(hexadecanediol) 및 트리아콘타놀(triacontanol-1-ol) 등이 함유되어 있으며, 그 외 마추스테린(matsusterin), 피토스테린(phytosterin), 시닉산(chinic acid), 시키믹산(shikimic acid), 퀘르세틴(quercetine) 및 캄페롤(kaempferol) 등이 함유되어 있다(赤松金芳 저, *신정 화한약*, pp664-665, 1980).

<21> 우리나라에서 자생하고 있는 소나무과의 솔잎에 대한 여러 가지 약리작용은 알려져 있지 않으나 단지동상 및 피부의 타박상부위에 대해서 응혈된 피부를 빨리 원상으로 회복 시켜주는 효과가 있으며, 습진, 욕 및 땀띠 등을 치유하는 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(박종갑 저, *한방대의전*, p134, 1984; 문화방송편저, *한국민간요법대전*, p21, 1988). 또한 명의별록에는 모발이 희어지는 것을 방지하는 효과도 있다고 언급되어있으며, 목초강목에는 부스럼, 모발개선, 내장을 튼튼하게 하여주고 수명을 연장한다고 언급되어 있다. 소취효과, 불면증 치유효과 및 피부 미용효과 등도 있으나, 상기 문헌 어디에도 솔잎 또는 이의 추출물의 항산화 활성에 대해서는 교시되거나 개시된 바가 없다.

<22> 이에, 본 발명자들은 TOSC 분석(assay)법을 이용한 실험을 통하여 솔잎 또는 이의 추출물의 항산화 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<23>

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<24> 본 발명의 목적은 항산화 활성을 갖는 솔잎 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화제, 동물 사료 첨가제 및 이를 포함하는 사료용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<25> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항산화 활성을 갖는 솔잎 또는 이의 추출물을 유효성분으로 하는 항산화제를 제공한다.

<26> 또한, 본 발명은 항산화 활성을 갖는 솔잎 또는 이의 추출물을 유효성분으로 하는 동물사료 첨가제 및 이를 포함하는 동물 사료용 조성물을 제공한다.

<27> 본원에서 정의되는 솔잎은 적송(red pine tree; *Pinus densiflora*), 일본오엽송(*Pinus pentaphylla*), 테다소나무(*Pinus taeda*), 구주소나무(*Pinus sylvestris*), 일본반송(*Pinus densiflora* var. *umbracuifera*), 만주곰솔소나무(*Pinus tabulaeformis* var. *mukdensis*), 리기다소나무(*Pinus rigida*), 곰솔소나무(*Pinus thunbergii*), 폰젠스소나무(*Pinus pungens*), 뱅크스소나무(*Pinus banksiana*), 반송(forma *multicaulis*), 해송(*Pinus thunbergii* parlatore), 황금소나무(forma *aurescens*), 용소나무(forma *anguina*), 둥근소나무(var *globosa*), 처진소나무(forma *pendula*), 도깨비방망이소나무(forma *aggregata*), 다닥다닥소나무(forma *bi-aggregata*), 금강송(forma *erecta*)의 잎, 바람직하게는 적송의 잎을 포함함을 특징으로 한다.

<28> 또한, 본원에서 정의되는 솔잎 추출물은 물 및 C₁ 내지 C₄의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매로부터 선택되어진 극성용매, 바람직하게는 50 내지 80 % 물 및 C₁ 내지 C₄의 저급알콜의 혼합용매, 보다 바람직하게는 50 내지 80 % 메탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

<29>

<30> * 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<31> 본 발명의 솔잎 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.

<32> 본 발명의 솔잎 추출물은, 건조된 솔잎을 세절하여 무게(kg)의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 10배의 물 및 메탄올, 에탄올 등의 C₁ 내지 C₄의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 메탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 50 내지 80% 혼합비의 물 및 메탄올 혼합용매로, 20℃ 내지 100℃, 바람직하게는 50℃ 내지 100℃ 추출온도에서 약 1시간 내지 10일, 바람직하게는 약 1시간 내지 5시간동안 냉침, 열수추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출방법을 이용하여 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 건조하여 본 발명의 솔잎 추출물을 수득할 수 있다.

<33> 본 발명은 상기 방법으로 수득된 항산화 활성을 갖는 솔잎 또는 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화제를 제공한다.

<34> 솔잎 및 이의 추출물의 항산화 활성을 지닌 조성물로서의 효능을 조사하기 위하여, TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity) 분석(assay)법을 이용하여 실험해 본 결과, 본 발명의 솔잎 추출물이 탁월한 항산화 활성을 가짐을 확인하였다.

<35> 본 발명의 솔잎 및 이의 추출물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

<36> 본 발명의 솔잎 또는 이의 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<37> 본 발명에 따른 솔잎 또는 이의 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium

carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지 및 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<38> 본 발명의 술잎 및 이의 추출물의 바람직한 투여량은 동물의 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 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<39> 본 발명의 술잎 및 이의 추출물은 쥐, 생쥐 및 가축 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

<40> 본 발명은 항산화 활성을 갖는 술잎 또는 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 동물사료 첨가제 및 이를 포함하는 동물 사료용 조성물을 제공한다.

<41> * 상기의 술잎 추출물은 20 내지 90 % 고농축액이거나 분말 또는 과립형태일 수 있다.

<42> 상기 술잎 추출물은 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산 및 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성피로인산염 및 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염이나 폴리페놀, 카테킨(catechin), 알파-토코페롤, 로즈메리 추출물(rosemary extract), 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산 및 피틴산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

<43> 본 발명의 술잎 또는 이의 추출물을 함유하는 동물사료 첨가제 및 이를 포함하는 동물 사료용 조성물은 보조성분으로 아미노산, 무기염류, 비타민, 항생물질, 항균물질, 항산화, 항곰팡이 효소 및 살아있는 미생물 제제 등과 같은 각종보조제가 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 것; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조 성분, 건조 첨가제를 모두 혼합한 후, 액체 성분과, 가열 후에 액체가 되는 성분, 즉, 지질, 예를 들면 가열에 의해 임의로 액화시킨 동물성 지방 및 식물성 지방 등과 같은 주성분 이외에 영양보충제, 소화 또는 흡수향상제, 성장촉진제 및 질병 예방제 등과 같은 물질과 함께 사용될 수 있다.

<44> 상기 술잎 및 이의 추출물은 동물에게 단독으로 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합되어 투여될 수 있다.

<45> 또한, 상기 술잎 및 이의 추출물은 탭 드레싱으로서 또는 이들을 동물 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도로, 별도의 경구 제형으로, 주사 또는 경피로 또는 다른 성분과 조합하여 쉽게 투여할 수 있다. 통상적으로, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 투여량 또는 분할 일일 투여량을 사용할 수 있다.

<46> 상기 술잎 및 이의 추출물을 동물 사료와 별도로 투여할 경우, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 추출물의 투여 형태는 이들을 비-독성 제약상 허용 가능한 식용 담체와 조합하여 즉석 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 콩 플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌 글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 추출물의 투여형은 정제, 캡슐제, 산제, 토로키제 또는 함당정제 및 미분산성 형태의 탭 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 연젤라틴 캡슐제 또는 시럽제, 액체 현탁액제, 에멀전제 및 용액제의 투여 형태일 수 있다. 또한, 투여 형태는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 및 용액 촉진제 등을 함유할 수 있다.

<47> 또한, 술잎 및 이의 추출물이 동물사료 첨가제로 포함되는 동물 사료용 조성물은 동물의 식이 요구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기 곡분일 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로 옥수수, 콩 곡분 또는 옥수수/콩 곡분 믹스로 주로 구성되어 있다.

- <48> 상기의 동물사료 첨가제는 침지, 분무 또는 혼합하여 상기 동물 사료용 조성물에 첨가하여 이용될 수 있다.
- <49> 본 발명은 포유류, 가금 및 어류를 포함하는 다수의 동물 식이에 적용할 수 있다. 보다 상세하게, 식이는 상업상 중요한 포유류, 예를 들어 돼지, 소, 양, 염소, 실험용 설치 동물 (랫트, 마우스, 햄스터 및 케르빌 루스쥐), 모피 소유 동물 (예, 밍크 및 여우), 및 동물원 동물 (예, 원숭이 및 꼬리 없는 원숭이) 뿐만 아니라 가축 (예, 고양이 및 개)에게 사용할 수 있다. 통상적으로 상업상 중요한 가금에는 닭, 터키, 오리, 거위, 꿩 및 메추라기가 포함된다. 송어와 같은 상업적으로 사육되는 어류도 포함될 수 있다.
- <50> 본 발명에 따른 술잎 또는 이의 추출물을 포함한 동물용 사료 배합 방법은, 술잎 추출물을 동물 사료에 건조 중량 기준으로 사료 1 kg당 약 1 g 내지 100 g의 양으로 혼입한다.
- <51> 또한, 사료 혼합물은 완전히 혼합한 후, 성분들의 분쇄 정도에 따라 경점성의 조립 또는 과립 물질이 얻어진다. 이것을 매시로서 공급하거나, 또는 추가 가공 및 포장을 위해 원하는 분리된 형상으로 형성한다. 이때, 저장 중에 분리되는 것을 방지하기 위해, 동물 사료에 물을 첨가하고, 이어서 통상의 펠릿화, 팽창화, 또는 압출 공정을 거치는 것이 바람직하다. 과잉의 물은 건조 제거될 수 있다.
- <52> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- <53> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <54> **실시예 1. 술잎 추출물의 제조**
- <55> 충남 공주시에서 채취한 적송(red pine tree; *Pinus Densiflora*)의 잎 80.45g을 2~4cm로 절단하고, 이를 80% 메탄올(methanol) 500ml에서 상온으로 각각 1시간씩 3번 초음파 추출(sonication)시켜 추출하였다.
- <56> 이 추출액을 증류기(evaporator)를 이용하여 45℃에서 2 시간동안 농축시킨 후, 3일간 동결건조하여 술잎 추출물 분말 5.34 g(6.64%)을 얻었으며, 이를 주사용 증류수에 녹여 시료로 조제하여 사용하였다.
- <57> **실시예 2. 시료의 준비**
- <58> 실시예 1에서 수득한 술잎 추출물이 첨가된 물질을 공급하기 전, 14일 후 및 24일 후에 각 실험동물의 경정맥에서 혈액을 취한 후, 바로 상온에서 1분간 5,000×g에서 원심분리하여 혈장을 얻고 분석시까지 -70℃에서 보관하였다. 항산화 활성을 측정하기 위해 주사용 증류수로 혈장을 200 또는 250배로 희석하여 사용하였다.
- <59>
- <60> ***참고예 1. 실험동물의 준비 및 사육조건**
- <61> 술잎 추출물을 시중에서 판매되는 비육돈 사료에 5% 함량으로 섞고 암컷 돼지를 각각 4두를 배치한 7주령의 삼원교잡종 [듀록(Duroc) X 랜드레이스(Landrace) X 라지화이트(Large white)] 돼지에게 0일, 14일 및 24일 동안 공급하였다. 돈방의 크기는 3 × 2.5m였으며, 사료는 자유 채식토록하고, 물은 자동급수기를 이용하여 자유로이 먹을 수 있도록 하였다.
- <62> **실험예 1. TOSC 법을 이용한 술잎 추출물의 항산화 활성 확인**
- <63> 술잎 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 TOSC(Total Oxyradical Scavenging Capacity) 분석(assay)법을 이용하여 하기와 같이 라디칼 소거능 실험을 실시하였다.
- <64> TOSC 분석(assay)은 윈스턴 등(Winston et al., *Free Radic. Biol. Med.*, Feb, 24(3), pp480-493, 1998)에 의해 제안되고 같은 저자들에 의해 수정된 방법(Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Apr 15, 156(2), pp96-105, 1999)을 이용하여 실시하였다. 퍼옥실 라디칼(Peroxyl radical)은 2,2'-아조비스아미디노프로판(ABAP, 2,2'-azobisamidinopropane)을 35℃에서 자유라디칼반응(thermal homolysis)시켜 발생시켰고(Winston et al., *Free Radic. Biol. Med.*, Feb, 24(3), pp480-493, 1998), 하이드록실 라디칼(Hydroxyl radical)은 철(Fe)과 아스코르브산염(ascorbate)을 이용한 펜톤 반응(Fenton reaction; Winston and Cederbaum, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 9(2), pp95-102, 1985)으로, 과산화질산염(peroxynitrite)은 SIN-1의 자연 분해(spontaneous decomposition)를 통해 발생시켰다. 발생한 각각의 활성 산소종(reactive oxygen species)은 KMBA (α-keto-γ-methiolbutyric acid)와 반응하여 에틸렌 가스(ethylene gas)를 발생하며 이 반응은 일정 범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로 보고된 바 있다(Winston et al., *Free Radic.*

Biol. Med., 24(3), pp480-493, 1998; Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156(2), pp96-105, 1999). 이어서 최종 용량(volume) 1 ml의 반응액을 고무로 된 셉텀(rubber septum)으로 밀폐된 10 ml 용기에 넣어 진행시켰다. 생성된 에틸렌 가스(Ethylene gas)의 검출을 위해 포로팩 N 컬럼(Poropack N column)과 불꽃 이온화검출기(FID, flame ionization detector)를 장착한 가스크로마토그래피(GC, gas chromatography)를 오븐(oven) 60℃, 인젝터(injector) 180℃ 및 디텍터(detector) 180℃로 고정하고, 이동상으로는 헬륨을 30ml/분 속도의 컬럼으로 주입하였다. 바이알(Vial)의 에틸렌 가스(ethylene gas) 정량을 위해 헤드-스페이스 법(head-space technique)을 이용하여 바이알 안의 공기를 가스 밀폐된(gas-tight) 주사기로 150 µl 취하고 인젝터(injector)에 주입하여 실험하였다.

운동곡선하면적(AUC, area under the kinetic curve)은 상기 실험측정치로부터 구한 그래프를 적분(integration)하여 얻었고, TOSC값은 하기 수식 1을 통하여 산출하였다.

수식 1

$$TOSC = 100 - (\int SA / \int CA \times 100)$$

$\int SA$ = 시료 반응의 곡선으로부터 적분한 범위

(integrated area from the curve of the sample reaction)

$\int CA$ = 대조군 반응의 곡선으로부터 적분한 범위

(integrated area from the curve of the control reaction)

옥시라디칼 소거능(oxyradical scavenging capacity)을 전혀 갖지 못하는 시료의 경우에는 $\int SA / \int CA = 1$ 이 되며, TOSC = 0의 값을 갖는다. 반대로 $\int SA \rightarrow 0$ 일때는, TOSC 값은 100에 접근한다. TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

표 1

구 분	퍼옥실 라디칼 (Peroxy Radical)	하이드록실 라디칼 (Hydroxyl Radical)	과산화질산염 (Peroxynitrite)
	(TOSC/mg)		
솔잎 추출물	3569 ± 239	807 ± 359	1068 ± 181
글루타치온 (Glutathione)	940 ± 93	257 ± 27	347 ± 3

상기 실시예 1에서 수득한 솔잎 추출물 및 글루타치온의 항산화 활성은 상기 표 1에 나타내었다. 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 대표적인 체내 항산화 물질인 글루타치온의 퍼옥실 라디칼에 대한 TOSC 값이 약 940 TOSC/mg으로 솔잎 추출물이 글루타치온에 비해 약 4배의 소거능 효과를 보였고(도1 및 도2 참조), 하이드록실 라디칼 소거능 효과는 글루타치온의 TOSC 값인 약 260과 비교하였을 때, 솔잎 추출물의 TOSC 값은 약 3배의 소거능 효과를 보였다(도3 및 도4 참조). 또한 과산화질산염에 대한 솔잎 추출물의 소거능 효과는 글루타치온의 TOSC 값인 약 347과 비교하였을 때, 솔잎 추출물의 TOSC 값은 약 3배의 소거능 효과를 보였다(도5 및 도6 참조).

본 실험 결과, 솔잎 추출물의 퍼옥실 라디칼, 하이드록실 라디칼 및 과산화질산염 소거능 효과는 글루타치온에 비하여 약 3-4배 높은 항산화 활성을 보였다.

실험예 2. TOSC 법을 이용한 솔잎 추출물의 항산화 효과

상기 실시예 1에서 수득한 솔잎 추출물 첨가 사료를 섭취한 돼지에서 얻은 혈장(실시예2 참조)의 항산화 활성을 측정하기 위하여 TOSC(Total Oxyradical Scavenging Capacity) 분석(assay)법을 이용하여 실험예 1과 같이 라디칼 소거능 실험을 실시하였다.

정상적인 사료(대조군) 또는 솔잎 추출물이 첨가된 사료(솔잎군)를 각각 0일, 14일 및 24일간 섭취한

돼지에서 얻은 혈장을 분석한 항산화 활성은 하기 표 2에 나타내었다.

<79> 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 정상적인 사료를 섭취한 돼지의 혈장으로부터 항산화 활성을 분석한 결과, 하이드록실 라디칼, 퍼옥실 라디칼 및 과산화질산염에 대한 항산화 활성은 각각 0일, 14일 및 24일에 큰 차이가 없었으나, 14일에 측정된 대표적인 체내 항산화 물질인 글루타치온의 퍼옥실 라디칼에 대한 TOSC 값은 87 ± 11 TOSC/%로 0일에 비하여 약 13% 감소하였다.

표 2

<80>

구 분	항산화 활성 (TOSC/%)					
	대조군			솔잎군		
	퍼옥실 라디칼	하이드록실 라디칼	과산화질산염	퍼옥실 라디칼	하이드록실 라디칼	과산화질산염
0 일 (n=4)	100 ± 14	100 ± 14	100 ± 20	100 ± 23	100 ± 19	100 ± 15
14 일 (n=4)	$87 \pm 11^*$	101 ± 6	96 ± 14	$153 \pm 17^*$	94 ± 26	$133 \pm 9^*$
24 일 (n=4)	107 ± 15	106 ± 20	99 ± 4	$161 \pm 22^*$	101 ± 21	$130 \pm 3^*$
* 0일과의 유의성은 paired-t test를 사용하여 유의수준 $P < 0.05$ 로 검정.						

<81>

<82> 14일 및 24일 동안 솔잎 추출물 첨가 사료를 섭취한 돼지에서 얻은 혈장의 퍼옥실 라디칼 및 과산화질산염에 대한 항산화 활성은 각각 53-61% 및 30-33%로 증가하였으나, 하이드록실 라디칼에 대한 항산화 효과에 유의적인 차이는 없었다. 또한 솔잎 추출물을 첨가한 사료를 14일 및 24일간 섭취한 돼지에서 얻은 혈장의 항산화 활성은 정상적인 사료를 섭취한 돼지보다 퍼옥실 라디칼 및 과산화질산염이 각각 약 1.5-1.8배 및 약 1.3배 높은 항산화 활성을 나타내었다.

<83> 본 실험 결과, 솔잎 추출물을 사료에 첨가하여 돼지를 사육할 경우 14일 이내에 혈장에서 퍼옥실 라디칼 및 과산화질산염에 대하여 우수한 항산화 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

<84> 모든 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 통계적 유의성을 검증하기 위해 쌍대 t-검정법(paired t-test, $p < 0.05$)을 수행하였다.

<85> 본 발명의 솔잎 추출물을 포함하는 사료 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<86> **사료조성물 예 1.**

<87>	솔잎 추출물	100 mg
<88>	솔잎 분말	16 mg
<89>	β -글루칸(β -glucan) 함유 추출물	0.7 mg
<90>	효모 배양물(yeast culture)	24 mg
<91>	비타민 E	0.7 mg
<92>	L-카르니틴	0.7 mg

<93> **제제예 1. 산제의 제조**

<94>	솔잎 분말	20 mg
<95>	유당	100 mg

- <96> 탈크 10 mg
- <97> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- <98> **제제예 2. 정제의 제조**
- <99> 솔잎 추출물 10 mg
- <100> 옥수수전분 100 mg
- <101> 유당 100 mg
- <102> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <103> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- <104> **제제예 3. 캡슐제의 제조**
- <105> 솔잎 추출물 10 mg
- <106> 결정성 셀룰로오스 3 mg
- <107> 락토오스 14.8 mg
- <108> 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg
- <109> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- <110> **제제예 4. 주사제의 제조**
- <111> 솔잎 추출물 10 mg
- <112> 만니톨 180 mg
- <113> 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- <114> $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- <115> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- <116> **제제예 5. 액제의 제조**
- <117> 솔잎 추출물 20 mg
- <118> 이성화당 10 g
- <119> 만니톨 5 g
- <120> 정제수 적량
- <121> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

발명의 효과

- <122> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 솔잎 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화제, 동물사료 첨가제 및 이를 포함하는 사료용 조성물은 독성 및 내성이 적고 항산화 활성을 나타내어 인간에게는 육질 개선, 이취 감소 및 각종 성인병 예방의 이익을, 가축에게는 소화력 증진, 사육 기간 단축, 사료비 절감 및 면역력 증대로 인한 각종 질병 예방의 이익을 주므로 농가 소득 증대에 기여할 수 있다.

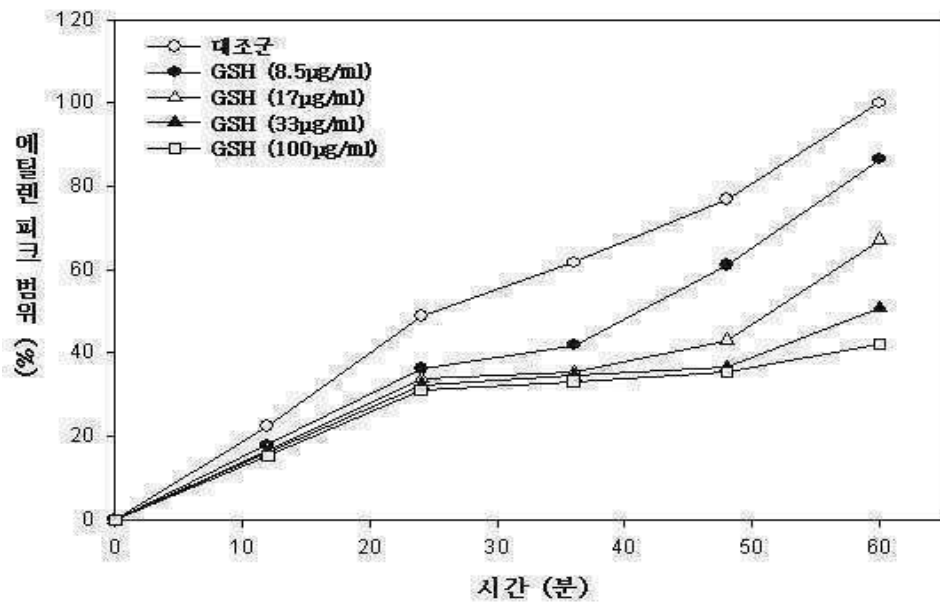
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 퍼옥실 라디칼에 대한 솔잎 추출물의 항산화 활성을 나타낸 도이고,
- <2> 도 2는 퍼옥실 라디칼에 대한 글루타치온의 항산화 활성을 나타낸 도이며,

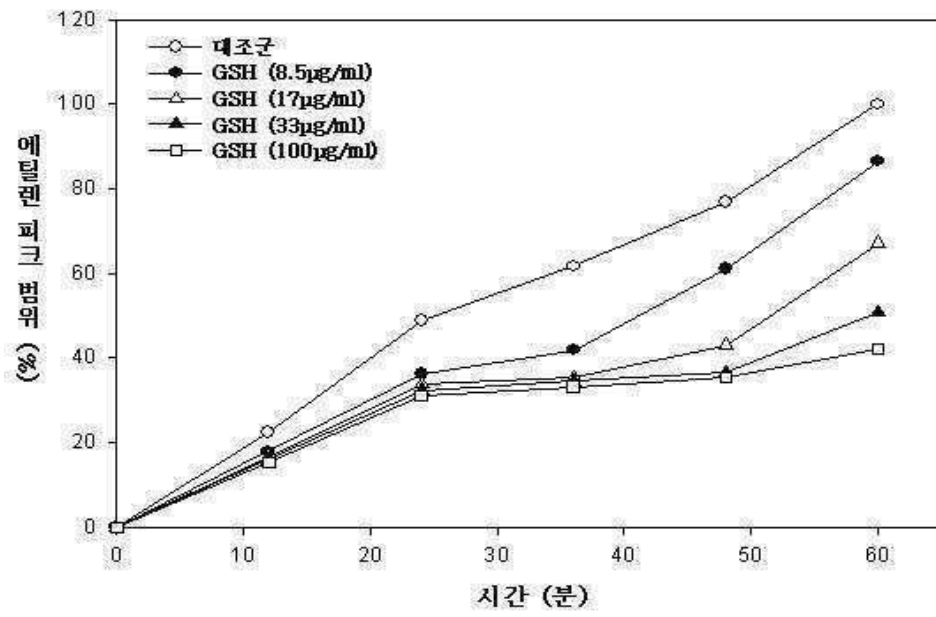
- <3> 도 3은 하이드록실 라디칼에 대한 술잎 추출물의 항산화 활성을 나타낸 도이고,
 <4> 도 4는 하이드록실 라디칼에 대한 글루타치온의 항산화 활성을 나타낸 도이며,
 <5> 도 5는 과산화질산염에 대한 술잎 추출물의 항산화 활성을 나타낸 도이고,
 <6> 도 6은 과산화질산염에 대한 글루타치온의 항산화 활성을 나타낸 도이다.
 <7>

도면

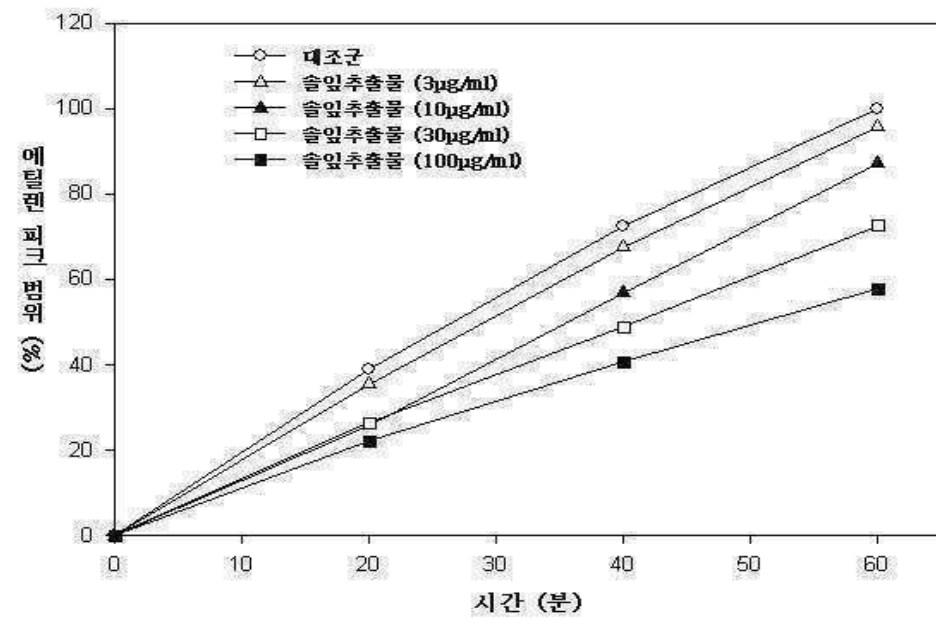
도면1



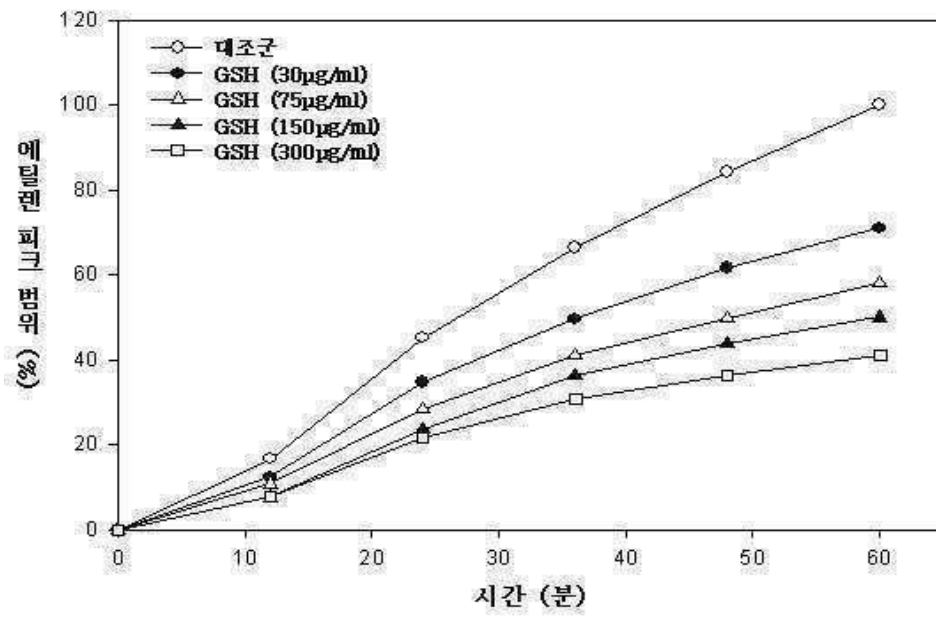
도면2



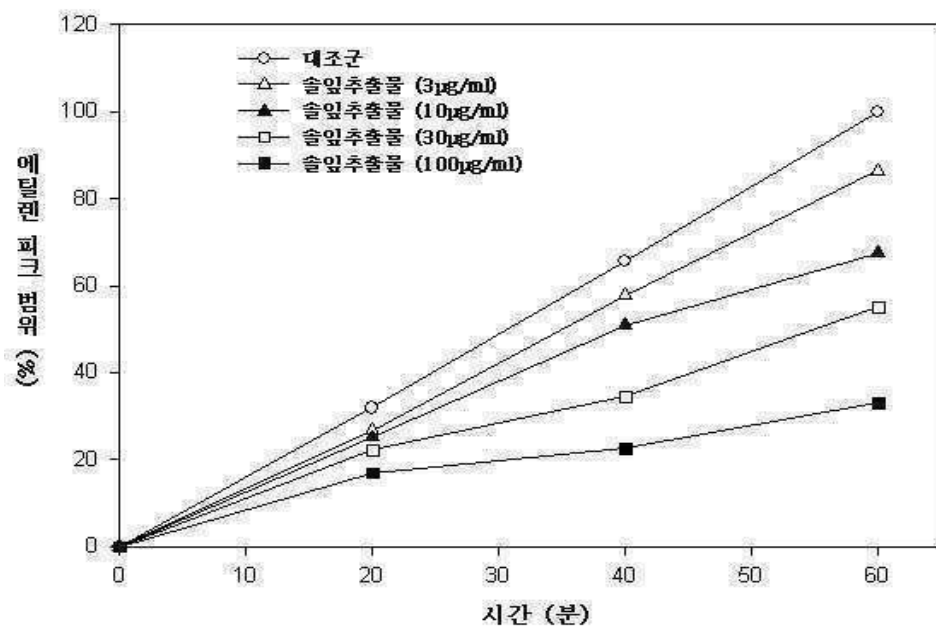
도면3



도면4



도면5



도면6

