

	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호	10-2012-0038031
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자	2012년04월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인	경상대학교산학협력단	
A23L 2/38 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)	경상남도 진주시 가좌동 900		
(21) 출원번호	10-2010-0097432	(72) 발명자	양재경
(22) 출원일자	2010년10월06일	경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 103-302	
심사청구일자	2010년10월06일	(74) 대리인	김윤근
		(74) 대리인	
		(74) 대리인	특허법인태백
		(74) 대리인	

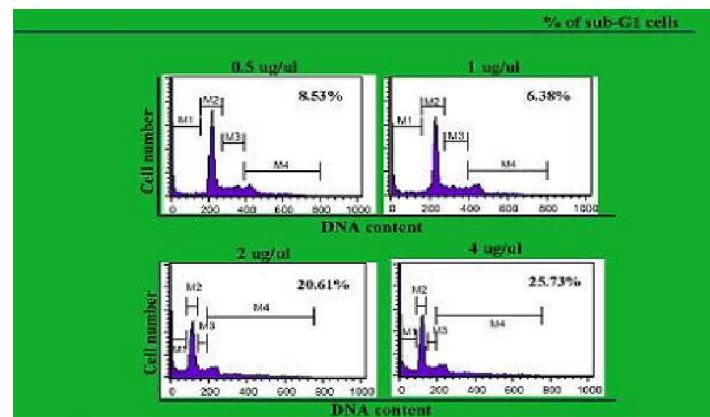
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 당귀의 열수 추출물과 건지황의 열수 추출물의 혼합물을 포함함으로써, 인지능력개선 효과를 가지면서도, 천연 약재를 이용함으로써 부작용의 위험은 적다. 또한, 한약재의 쓴맛을 보완하여 기능성 음료로서 용이하게 섭취할 수 있다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

권정민

울산광역시 울주군 온양읍 남창강변로 93, 현대아파트 103동 1105호

최석영

경상남도 창원시 마산합포구 교방서5길 45, 수경아파트 102호 (교방동)

하영래

경상남도 진주시 강남로 45, 105동 1602호 (주약동, 금호석류마을)

정지영

경상남도 사천시 향촌동 9차 에이스빌라 가동 403호

특허청구의 범위

청구항 1

당귀의 추출물 50 내지 70 중량% 및 건지황의 추출물 30 내지 50 중량%를 혼합한 한약재의 추출물을 포함하는 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 인지기능 개선용 기능성 음료는,

당귀의 열수 추출물 50 내지 70 중량% 및 건지황의 열수 추출물 30 내지 50 중량%를 혼합한 한약재의 열수 추출물 84 내지 88중량%;

프락토올리고당 액상 10 내지 13 중량%;

프락토올리고당 파우더 1 내지 4 중량%; 및

향료 0.25 내지 0.55 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항 어느 한 항에 있어서, 상기 한약재 추출물은 당귀의 열수 추출물 50중량% 및 건지황의 열수 추출물 50중량%로 혼합된 것을 특징으로 하는 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 향료는 대추향, 복분자향, 매실향, 파인애플향, 사과향, 오렌지향, 레몬향, 포도향, 체리향, 복숭아향, 살구향, 딸기향, 망고향, 라임향, 메론향, 오디향, 인삼향, 홍삼향, 생강향, 유자향, 박하향 및 커피향으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 인지기능 개선용 기능성 음료.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 한약재의 열수 추출물의 농도가 0.5 내지 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 인 것을 특징으로 하는 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 한약재의 열수 추출물의 농도가 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 인 것을 특징으로 하는 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료.

청구항 7

당귀의 열수 추출물 50 내지 70중량% 및 건지황의 열수 추출물 30 내지 50중량%를 혼합한 한약재의 열수 추출물을 얻는 단계; 및

상기 한약재의 열수 추출물 84 내지 88중량%, 프락토올리고당 액상 10 내지 13 중량%, 프락토올리고당 파우더 1 내지 4 중량% 및 향료 0.25 내지 0.55 중량% 혼합하여 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료를 제조하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 한약재 열수 추출물은 당귀의 열수 추출물 50중량% 및 건지황의 열수 추출물 50중량%로 혼합된 것이며, 상기 한약재 열수 추출물의 농도가 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 향료는 대추향인 것을 특징으로 하는 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료를 제조하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 의료기술 발달로 사람의 평균 수명이 증가되고 전 세계적으로 노인 인구가 증가함에 따라 치매 환자도 증가하여 치매노인 관리가 심각한 사회문제로 대두되고 있으며 우리나라의 치매 유병률은 치매 유형 및 지역에 따라 다르지만 1997년에 65세 이상 노인의 8.3%였으며 2010년에는 8.6%, 2020년에는 9%로 증가 될 것으로 추정되고 있다.

[0003] 치매는 증상군으로 질환이 진행되면서 인지 장애와 기능장애가 더욱 심해져, 조기 진단과 조기 치료가 중요하며 혈관성 치매는 초기에 진단하여 치료하면 더 이상의 진행을 막을 수 있고, 퇴행성 질환인 알츠하이머형 치매도 조기 발견하여 약물치료하면 병을 지연시킬 수 있어 조기 발견 및 예방이 매우 중요하다.

[0004] 이에 따라, 최근 치매 등으로 인해 저하된 인지기능 및 학습기능을 개선시키고 향상시키는 다양한 치료전략을 수립하고 효과적인 약물을 개발하고자 하는 노력이 시도되고 있다. 현재까지 개발된 기억력 개선 약물들에는 아세틸콜린성전구체(acetylcholine precursor), 수용체 활성제(Receptor agonist), 아세틸콜린분해 억제제(Acetylcholine esterase inhibitor, AchEI) 등이 있으나 효과가 일시적이고 미약하며 심각한 부작용 및 독성 때문에 아직 사용에 논란의 여지가 많은 상태이다. 그러므로, 부작용이 적으며, 효능이 좋고, 원인적 치료(뇌병변의 개선)까지 가능한 새로운 기억력 개선 효과를 갖는 조성물 찾아내고 효과를 입증하여 개발하려는 노력이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 인지기능 및 학습기능을 향상시킬 수 있는 천연 약재로서 한약재의 추출물의 인지기능 개선 효과 등을 연구하는 과정에서, 당귀 및 건지황의 인지기능 개선 효과가 큰 것을 확인하였고, 추출용매 및 추출방식에 따른 효과 등을 통해 추출용매와 추출방식을 선정하였고, 최적 혼합 비율 및 농도 등을 실험하여 혼합물의 혼합에 따른 상승효과를 확인하였으며, 인지개선 기능성 음료로서 맛의 개선 및 기호성 등을 고려한 최적 조성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 본 발명의 목적은 당귀나 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료를 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 당귀나 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료의 제조 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 당귀의 추출물 50 내지 70 중량% 및 건지황의 추출물 30 내지 50 중량%를 혼합한 한약재의 추출물을 포함하는 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료를 제공한다.

[0009] 상기 인지기능 개선용 기능성 음료는 당귀의 열수 추출물 50 내지 70 중량% 및 건지황의 열수 추출물 30 내지 50 중량%를 혼합한 한약재의 열수 추출물 84 내지 88중량%; 프락토올리고당 액상 10 내지 13 중량%; 프락토올리고당 파우더 1 내지 4 중량%; 및 향료 0.25 내지 0.55 중량%를 포함할 수 있다.

[0010] 상기 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료에서 당귀의 열수 추출물 50 내지 70 중량% 및 건지황의 30 내지 50중량%를 혼합한 한약재 혼합물은 동일 농도를 갖는 당귀만 포함하는 한약재 열수 추출물 또는 건지황만 포함하는 한약재 열수 추출물인 경우 보다 산화 스트레스의 효과가 클 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 한약재 열수 추출물은 상기 당귀의 열수 추출물 50중량% 및 건지황의 열수 추출물 50중량%로 혼합될 수 있다.

[0012] 이 경우, 산화 스트레스의 억제 효과에 대한 효과가 동일 농도의 당귀 열수 추출물인 경우 또는 건지황 열수 추출물 보다 개선 효과가 가장 클 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 향료는 대추향, 복분자향, 매실향, 파인애플향, 사과향, 오렌지향,

레몬향, 포도향, 체리향, 복숭아향, 살구향, 딸기향, 망고향, 라임향, 메론향, 오디향, 인삼향, 홍삼향, 생강향, 유자향, 박하향 및 커피향으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0014] 특히, 대추향의 경우, 당귀와 건지황의 향과의 조화가 뛰어나서 인지기능 개선용 기능성 음료의 기호도를 개선할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 한약재의 열수 추출물의 농도가 0.5 내지 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 일 수 있다.

[0016] 상기 한약재의 열수 추출물의 농도가 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 미만이거나 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 초과할 경우 산화 스트레스 억제 효과 등 인지개선효과가 미미할 수 있다. 특히, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이상일 경우 세포독성이 나타날 수 있으므로 바람직하지 않을 수 있다. 그러나, 상기 한약재의 열수 추출물의 농도가 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 인 경우에는 산화 스트레스의 억제 효과 등 인지개선효과 등이 뛰어날 수 있다.

[0017] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 당귀의 열수 추출물 50 내지 70중량% 및 건지황의 열수 추출물 30 내지 50중량%를 혼합한 한약재의 열수 추출물을 얻는 단계; 상기 한약재의 열수 추출물 84 내지 88중량%, 프락토올리고당 액상 10 내지 13 중량%, 프락토올리고당 파우더 1 내지 4 중량% 및 향료 0.25 내지 0.55 중량% 혼합하여 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료를 제조하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 한약재 열수 추출물은 당귀의 열수 추출물 50중량% 및 건지황의 열수 추출물 50중량%로 혼합된 것이며, 상기 한약재 열수 추출물의 농도가 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이고, 상기 향료는 대추향일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 당귀의 열수 추출물 및 건지황의 열수 추출물을 얻는 방법은 환류냉각 방식, 마이크로파 방식, 고온(고압) 방식으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 추출 효율에서 가장 우수한 방식은 고온(고압) 방식일 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료는 당귀의 열수추출물과 건지황의 열수추출물의 혼합물을 포함함으로써, 인지능력개선 효과를 가지면서도, 천연 약재를 이용함으로써 부작용의 위험은 적다. 또한, 한약재의 쓴맛을 보완하여 기능성 음료로서 용이하게 섭취할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 환류냉각 방식에 의해 추출된 당귀의 에탄올 추출물(a) 및 열수 추출물(b)과 냉동 건조하여 조제된 당귀의 에탄올 추출물 분말(c) 및 열수 추출물 분말(d)을 보여주는 사진이다.

도 2는 환류냉각 방식에 의해 추출된 건지황의 에탄올 추출물(a)과 열수 추출물(b), 냉동 건조하여 조제된 건지황의 에탄올 추출물 분말(c) 및 열수 추출물 분말(d)을 보여주는 사진이다.

도 3은 당귀를 100℃에서 90분간 증숙 처리한 후의 시료(a), 당귀를 120℃에서 90분간 증숙 처리한 후의 시료(b)와 당귀를 100℃에서 90분간 증숙 처리한 후의 시료를 환류냉각 방식에 따라 열수 추출한 열수 추출물 분말(c) 및 당귀를 120℃에서 90분간 증숙 처리한 후의 시료를 환류냉각 방식에 따라 열수 추출한 열수 추출물 분말(d)을 보여주는 사진이다.

도 4는 건지황을 100℃에서 90분간 증숙 처리한 후의 시료(a), 건지황을 120℃에서 90분간 증숙 처리한 후의 시료(b)와 건지황을 100℃에서 90분간 증숙 처리한 후의 시료를 환류냉각 방식에 따라 열수 추출한 열수 추출물 분말(c) 및 건지황을 120℃에서 90분간 증숙 처리한 후의 시료를 환류냉각 방식에 따라 열수 추출한 열수 추출물 분말(d)을 보여주는 사진이다.

도 5는 당귀의 열수 추출물 및 에탄올 추출물이 SK-N-SH 세포의 증식(proliferation)에 미치는 효과를 설명하기 위한 그래프이다. 상기 세포에 각각 당귀의 열수 추출물 및 에탄올 추출물을 처리하고, 2시간 후에 H_2O_2 를 처리하고, 2시간 후에 세포 증식을 MTT 분석법으로 측정한 결과를 나타내는 그래프이며, x축은 추출물의 농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 나타내며, y축은 성장률(%)을 나타낸다.

도 6은 건지황의 열수 추출물 및 에탄올 추출물이 SK-N-SH 세포의 증식에 미치는 효과를 설명하기 위한 그래프이다. 상기 세포에 각각 건지황의 열수 추출물 및 에탄올 추출물을 처리하고, 2시간 후에 H_2O_2 를 처리하고, 2시간 후에 세포 증식을 MTT 분석법으로 측정한 결과를 나타내는 그래프이며, x축은 추출물의 농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 나타내며, y축은 성장률(%)을 나타낸다.

도 7은 당귀의 열수 추출물과 당귀의 증숙 처리 후의 열수 추출물이 SK-N-SH 세포의 증식에 미치는 효과를 설명하기 위한 그래프이다. 상기 세포에 각각 당귀의 열수 추출물과 당귀의 증숙 처리 후의 열수 추출물(당귀 증숙 처리를 100℃에서 90분 처리 및 120℃에서 90분 처리) 처리하고, 2시간 후에 H₂O₂를 처리하고, 2시간 후에 세포 증식을 MTT 분석법으로 측정한 결과를 나타내는 그래프이며, x축은 추출물의 농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 나타내며, y축은 성장률(%)을 나타낸다.

도 8은 건지황의 열수 추출물과 건지황의 증숙 처리 후의 열수 추출물이 SK-N-SH 세포의 증식에 미치는 효과를 설명하기 위한 그래프이다. 상기 세포에 각각 건지황의 열수 추출물과 건지황의 증숙 처리 후의 열수 추출물(건지황 증숙 처리를 100℃에서 90분 처리 및 120℃에서 90분 처리) 처리하고, 2시간 후에 H₂O₂를 처리하고, 2시간 후에 세포 증식을 MTT 분석법으로 측정한 결과를 나타내는 그래프이며, x축은 추출물의 농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 나타내며, y축은 성장률(%)을 나타낸다.

도 9는 세포주기의 각 기(phase)에 함유된 DNA 함량을 측정한 결과를 보여준다. SK-N-SH 세포에 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 당귀 열수 추출물 및 건지황의 열수 추출물의 혼합물(1:1, w/w)을 처리하고, 2시간 후에 H₂O₂를 처리하고 시간 경과에 따른 유세포 분석결과를 보여주며, x축은 DNA 함량을 나타내며, y축은 세포수를 나타낸다.

도 10은 세포주기의 각 기에 함유된 DNA 함량을 측정한 결과를 보여준다. SK-N-SH 세포에 각각 0.5, 1, 2 및 $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 당귀 열수 추출물 및 건지황의 열수 추출물의 혼합물(1:1, w/w)을 처리하고, 2시간 후에 H₂O₂를 처리하고 2시간 후의 유세포 분석결과를 보여주며, x축은 DNA 함량을 나타내며, y축은 세포수를 나타낸다.

도 11은 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1 w/w)을 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도로 2시간 처리하고 H₂O₂ 처리시간에 따른 형태학적 변화를 현광현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 12는 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1 w/w)을 농도별(0, 0.5, 1, 2 및 $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 2시간 처리하고 H₂O₂를 2시간 처리에 따른 형태학적 변화를 현광현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 13은 당귀의 휘발성화합물 가스 크로마토그램 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 건지황의 휘발성화합물 가스 크로마토그램 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 실험예 1. 당귀와 건지황으로부터의 추출물의 분리

[0024] (1) 재료

[0025] 국내산 당귀(*Anjelica gigas*) 및 건지황(*Rehmannia glutinosa*)은 경남생약농협(경남 산청군 금서면 특리 1300-1)에서 구입하여 시료로 사용하였다.

[0026] (2) 추출물의 분리 및 조제

[0027] 각각의 추출물의 함량은 하기 수학적 식 1에 의하여 계산하였다.

[0028] [수학적 식 1]

[0029] $E = (S - L) / S \times 100$

[0030] 상기 식에서, E는 추출물 함량(%), S는 시료의 건조중량(g), L은 여과 후 시료의 건조중량(g)을 나타낸다.

[0031] 1) 추출 용매에 따른 추출물의 분리 및 조제

[0032] 가. 에탄올 추출(환류냉각방식 이용)

[0033] 칭량병 및 유리여과기(glass filter 2G3)를 미리 칭량하고 정칭한 당귀, 건지황 4g을 둥근바닥 플라스크에 넣어 에탄올 600ml를 가한다. 플라스크에 환류냉각기를 부착하여 히팅 맨틀(heating mantle)에서 5시간 동안 끓이고 그 다음에 유리여과기에서 여과 후 에탄올로 세정하고 추출잔류물이 들어 있는 유리여과기를 칭량병으로 옮겨 항온건조기 105±3℃에서 24시간 건조 후 데시케이터내에서 방랭 하여 칭량한다. 또한 추출물의 분석 및 효능

평가를 위하여 추출 후 추출액은 감압 농축한 다음 냉동 건조기를 사용하여 분말 상태로 조제하였다.

나. 열수 추출(환류냉각방식 이용)

칭량병 및 유리여과기(2G3)를 미리 칭량하고 정칭한 당귀, 건지황 4g을 둥근바닥 플라스크에 넣어 증류수 600ml을 가한다. 플라스크에 환류냉각기를 부착하여 히팅 맨틀에서 5시간 동안 끓이고 그 다음에 유리여과기에서 여과 후 에탄올로 세정하고 추출잔류물이 들어 있는 유리여과기를 칭량병으로 옮겨 항온건조기에서 $105 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 24시간 건조 후 데시케이터내에서 방랭 하여 칭량한다. 또한 추출물의 분석 및 효능 평가를 위하여 추출 후 추출액은 감압 농축한 다음 냉동 건조기를 사용하여 분말 상태로 조제하였다.

2) 증숙 처리 후의 추출

당귀, 건지황 30g을 비커에 넣어 호일을 덮은 후 고온(고압)장치에서 각각 100°C 및 120°C ($1.0\text{--}1.2\text{kg}/\text{cm}^2$)에서 90분간 증숙 처리 후 $45 \pm 3^\circ\text{C}$ 항온 건조기에서 24시간 건조시켰다. 증숙 처리된 당귀, 건지황은 환류냉각 방식으로 열수 추출 하였다. 또한 추출물의 분석 및 효능 평가를 위하여 추출 후 추출액은 감압 농축한 다음 냉동 건조기를 사용하여 분말 상태로 조제하였다.

(3) 추출물의 함량

표 1 내지 표 2는 추출물의 %는 건조 중량을 기초로 계산한 값이며, 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 던칸의 다중범위 시험(Duncan's new multiple range test)을 이용하였으며, 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의차(significant difference) $P < 0.05$ 이었다.

1) 추출 용매에 따른 추출물의 함량

가. 에탄올 추출물 함량

표 1은 당귀 및 건지황의 에탄올 추출물의 함량을 나타낸다.

표 1

시료	추출물(%)
당귀	25.0 ± 0.6
건지황	20.4 ± 1.0

나. 열수 추출물 함량

표 2는 당귀 및 건지황의 열수 추출물 함량을 나타낸다.

표 2

시료	추출물(%)
당귀	32.4 ± 3.1
건지황	73.5 ± 0.4

당귀 및 건지황 모두 에탄올용매 보다 열수용매에 의한 추출물의 함량이 높은 것으로 나타났으며, 특히 건지황의 경우, 약 3.5배 이상 추출물의 함량이 높은 것을 확인할 수 있었다.

실험예 2. 당귀 및 건지황 추출물의 인지기능성 실험

(1) 재료 및 방법

1) 시료

신경모세포 SK-N-SH 세포의 산화 스트레스(oxidative stress) 대한 당귀 및 건지황 추출물의 효과를 분석하기 위해 당귀 열수 추출물 분말, 당귀 에탄올 추출물 분말, 건지황 열수 추출물 분말, 건지황 에탄올 추출물 분말(상기 '실험예 1. 당귀와 건지황으로부터 추출물의 분리' 방법으로 얻은 시료)을 시료로 사용하였다(도 1 및 도 2 참조).

- [0052] 신경모세포 SK-N-SH 세포의 산화 스트레스에 대한 증숙 처리 효과를 분석하기 위해 당귀, 건지황을 오토클레이브(autoclave)에서 100℃ 및 120℃(1.0-1.2kg/cm²)에서 90분간 증숙 처리한 후 열수 추출 및 에탄올 추출하여 시료(상기 ‘실험예 1의 2) 증숙 처리 후의 추출’ 방법으로 얻은 시료)로 사용하였다(도 3 및 도 4 참조).
- [0053] 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물의 SK-N-SH 신경모세포에 대한 산화 방어 효과를 분석하기 위해, 상기 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물을 1:1(w/w)로 혼합하여 시료로 사용하였다.
- [0054] 2) 세포배양과 시료처리
- [0055] 가. 1차 배양(Primary culture)
- [0056] 냉동(Freezing) 되어있는 신경모세포 SK-N-SH 세포(Korea cell line bank, Seoul, Korea)를 37℃의 항온조(water bath)에서 녹인 후, 15ml 팔콘 튜브(falcon tube)로 옮겨 원심분리(1,500rpm, 5분) 하였다. 상층액을 제거한 후 PBS(Gibco Isaland, NY, USA)를 10ml 첨가하여 다시 원심분리(1,500rpm, 5분)후 상층액을 제거하고 10% 소태아혈청(FBS, Gibco BRL)에 1%의 페니실린(penicillin) 및 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 DMEM/F-12 시딩(seeding) 배지(Gibco BRL)를 일정량(남아있는 펠렛(pellet)의 양에 따라) 첨가한 후 20cm 배양 디쉬에 분주 후 20ml의 DMEM/F-12 시딩 배지를 넣고 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.
- [0057] 나. 계대배양(Sub-culture)
- [0058] 배양 디쉬의 80% 정도 세포가 증식하면 0.25% 트립신(trypsin) EDTA(Gibco, BRL)를 1~2ml 처리하고 37℃에서 5분간 배양 후 트립신 EDTA와 동일량의 DMEM/F-12 시딩 배지를 첨가하여 이를 15ml 팔콘 튜브로 옮겨 원심분리(1,500rpm, 5분)하였다. 상층액을 제거한 후 일정량의 DMEM/F-12 시딩 배지를 첨가하여 피펫팅 후 또 다른 20cm 배양 디쉬에 분주 후 DMEM/F-12 시딩 배지를 20ml 넣고 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.
- [0059] 다. 계대배양(Sub-culture) 및 시료처리
- [0060] 혈구계수기(Heamacytometer)를 이용하여 세포수를 세어 24 웰 플레이트에 1.5×10^5 세포수/웰로 분주한 후 24시간 배양하고 PBS(Gibco, BRL)를 100μl/웰로 분주하여 세척한 후 제거하고 여기에 한약재 추출물들(10μg/μl)을 농도별(0, 0.5, 1, 2 및 4 μg/μl)로 FBS가 들어있지 않은 DMEM/F-12 배지(SFM) 500μl/웰로 희석하여 처리하였다. 2시간 경과 후 배지를 제거하고 PBS 각 웰에 100μl/웰로 분주하여 세척 후 1,000배 희석한 H₂O₂를 10.9μl (250 μM)를 SFM 500μl에 희석하여 처리하고 2시간 배양하였다.
- [0061] 라. 세포수 세기(Cell counting)
- [0062] 배양 디쉬의 80%정도 세포가 증식하면 0.25% 트립신 EDTA(Gibco, BRL)를 1~2ml 처리하고 37℃에서 5분간 배양 후 트립신 EDTA와 동일량의 DMEM/F-12 시딩 배지를 첨가하여 피펫팅한 후 이를 15ml 팔콘 튜브로 옮겨 원심분리(1,500 rpm, 5분)하였다. 상층액 제거 후 일정량의 DMEM/F-12 시딩 배지를 첨가하여 피펫팅한 후 1ml의 E-tube에 0.4% 트리판 블루(trypan blue) 500μl와 PBS 300μl를 넣고 앞의 희석되어진 세포 200μl를 넣고 혼합(vortexing)한 후, 혈구계수기 위에 커버글라스를 얹고 상기 세포 10μl 떨어뜨린 후 현미경으로 세포의 수를 세었다.
- [0063] 마. MTT 분석
- [0064] 상기 방식으로 배양한 cell에 PBS 100μl/웰씩 분주하여 세척한 후 이를 제거하고 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium) 시약을 0.005g/ml 농도가 되게 PBS로 희석하여 0.22μm 시린지 필터(syringe filter)로 필터링한 후 100μl씩 분주하고 은박지를 씌워 3시간 동안 37℃에서 배양하였다. 그 후 MTT 시약을 제거하고 PBS 100μl로 세척 후 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 200μl씩 분주하여 웰에 생성된 포르마잔 결정(formazan crystal)을 녹인 후 96 웰 플레이트에 100μl/웰로 옮겨서 마이크로플레이트 리더(microplate reader; Anthos Labtech Instruments, Wals., Austria)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0065] 바. 유세포분석기(Flow cytometer)를 이용한 아포토틱(Apoptotic) Sub-G1기 분석
- [0066] 15cm 배양 디쉬에 세포를 2×10^6 세포수/ml씩 분주하고 DMEM/F-12 시딩 배지를 10ml씩 첨가하여 24시간동안 배양하고 PBS 5ml를 넣고 세척한 후 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1, w/w)을 0, 0.5, 1, 2 및 4μg/μl(0, 500, 1000, 2000 및 4000μl)농도로 SFM(serum free media) 10ml에 희석하여 처리하고 2시간동안 배양하였다. PBS 5ml를 넣고 세척한 후 1,000배 희석한 H₂O₂ 217μl(250 μM)씩 처리하고 시간별로 배양 후 PBS 5ml

을 이용하여 세척하였다(3번). PBS 제거 후 0.25% 트립신 EDTA를 1ml 처리 후 5분간 배양한(37℃, 5분) 후 피펫팅하고 이를 1ml E-tube로 옮겨서 2,500rpm에서 5분간 원심분리 후 트립신 EDTA를 제거하고 PBS 1ml로 세척하였다(3번). PBS를 제거하고 남아있는 펠렛에 차가운 70% EtOH 1ml을 처리하여 4℃에서 24시간 동안 고정 후 다시 PBS 1ml로 세척(3번)하고, 1mg/ml의 RNase와 50μg/ml의 PI(Propidium Iodide)가 함유되어있는 PBS를 500μl씩 처리한 다음 배양(37℃, 20분)시켰다. 이를 FACS용 튜브로 옮겨 FACS Calibur flow cytometer(BD Bioscience, San Jose, CA)를 이용하여 10,000여개의 세포 DNA 함량을 분석하였다. 데이터는 CellQuest Pro(BD Biosciences) 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[0067] 사. Hoechst 33258 염색

[0068] 30mm 배양 디쉬에 슬라이드 글라스를 얹고 세포를 5×10^5 세포수/ml씩 분주하고 DMEM/F-12 시딩 배지를 2ml씩 첨가하여 24시간동안 배양하고 PBS 1ml를 넣고 세척한 후 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 혼합물(1:1, w/w)(10mg/ml)을 0, 0.5, 1, 2 및 4μg/μl 농도로 무혈청 배지(serum free media; SFM) 2ml에 희석하여 처리하고 2시간동안 배양하였다. PBS 1ml을 넣고 세척한 후 1,000배 희석한 H₂O₂ 43.5μl(250 μM)씩 처리하고 시간별로 배양 후 PBS 1ml을 이용하여 세척하였다(3번). 여기에 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 처리하여 4℃에서 30분 동안 고정시켰다. 고정시킨 세포를 PBS를 이용하여 3번 세척한 후 1mg/ml Hoechst 33258이 함유된 PBS를 5μl 처리하여 상온에서 30분간 염색하였다. 그리고 형광현미경(Olympus DP70 Digital Camera System)을 이용하여 핵 염색을 관찰하였다.

[0069] (2) 결과

[0070] 1) 신경모세포 SK-N-SH 세포의 산화 스트레스에 대한 한약재 추출물의 효과

[0071] 상기 한약재 추출물이 신경모세포 SK-N-SH 세포에 대한 기억력 증진 효과를 검토하기 위해 먼저 상기 세포에 H₂O₂를 처리하여 산화 스트레스를 유발하고 이에 대한 상기 당귀와 건지황으로부터 추출물의 분리한약재 추출물의 효과를 조사하였다. 한약재 추출물을 각각 0, 0.5, 1, 2 및 4μg/μl 농도로 처리한 다음 2시간 후에 H₂O₂를 처리하였다. 그 후 2시간 후에 MTT 분석법으로 세포의 생육정도를 측정하였다.

[0072] 도 5는 당귀 열수 추출물과 당귀 에탄올 추출물의 산화 스트레스에 대한 효과를 나타내는 그래프이다. 즉, 당귀의 열수 추출물 및 에탄올 추출물이 SK-N-SH 세포의 증식(proliferation)에 미치는 효과를 설명하기 위한 그래프이다. 당귀 열수 추출물은 1μg/μl 농도까지 SK-N-SH 세포 증식을 139%까지 증가시켰고, 2μg/μl 이상의 농도에서는 이 세포에 대한 강한 독성을 나타내었다. 반면에 에탄올 추출물은 열수 추출물보다는 효과가 낮았고, 역시 2μg/μl 농도 이상에서는 독성이 나타났다. 따라서 당귀의 경우 열수 추출물 1μg/μl의 농도가 가장 바람직함을 확인할 수 있었다.

[0073] 도 6은 건지황의 열수 추출물과 건지황의 에탄올 추출물의 산화 스트레스에 대한 효과를 나타내는 그래프이다. 즉, 건지황의 열수 추출물 및 에탄올 추출물이 SK-N-SH 세포의 증식에 미치는 효과를 설명하기 위한 그래프이다. 건지황 열수 추출물은 1μg/μl 농도까지 SK-N-SH 세포의 성장률을 122%까지 증가시켰고, 2μg/μl 이상의 농도에서는 이 세포에 대한 강한 독성을 나타내었다. 반면에 에탄올 추출물은 전 농도에서 독성을 나타내었다. 따라서 건지황의 경우 열수 추출물 1μg/μl의 농도가 가장 바람직함을 확인할 수 있었다.

[0074] 2) 신경모세포 SK-N-SH 세포의 산화 스트레스에 대한 증숙 처리 추출물의 효과

[0075] 당귀 및 건지황에 대한 증숙 처리 후의 열수 추출물에 대한 효과를 검토하였다. 당귀 및 건지황을 100℃ 및 120℃(1.0-1.2kg/cm²)에서 90분간 증숙 처리한 후 열수 추출하였다.

[0076] 도 7은 당귀의 열수 추출물과 증숙 처리(100℃, 90분), (120℃, 90분) 후 열수 추출물의 SK-N-SH 세포에 대한 산화 스트레스 억제효과를 나타내는 그래프이다. 즉, 당귀의 열수 추출물과 당귀의 증숙 처리 후의 열수 추출물이 SK-N-SH 세포의 증식에 미치는 효과를 설명하기 위한 그래프이다. 당귀 열수 추출물을 농도별 0, 0.5, 1, 2 및 4μg/μl 처리한 결과 각각 100, 131, 150, 101 및 63%의 세포 성장률을 나타내었다. 이 때, 2μg/μl의 농도에서부터 세포 성장률이 감소하였다. 당귀 증숙 처리(100℃, 90분) 후 열수 추출물, 당귀 증숙 처리(120℃, 90분) 후 열수 추출물 역시 농도별 0, 0.5, 1, 2, 4μg/μl 처리한 결과 각각 100, 123, 106, 54 및 40%, 100, 133, 116, 54 및 42%의 세포 성장률을 나타내었고, 이 두 시료 모두 1μg/μl의 이상의 농도에서부터 세포 성장률이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 증숙 처리는 오히려 세포의 성장을 억제하여 비증숙 처리가 효과가 큼을 확인할 수 있었다.

[0077] 도 8은 건지황 열수 추출물과 증숙 처리 (100℃, 90분), (120℃, 90분)후 열수 추출물의 SK-N-SH 세포에 대한 산화 스트레스 억제효과를 나타내는 그래프이다. 즉, 건지황의 열수 추출물과 건지황의 증숙 처리 후의 열수 추출물이 SK-N-SH 세포의 증식에 미치는 효과를 설명하기 위한 그래프이다. 건지황 열수 추출물을 농도별 0, 0.5, 1, 2 및 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 처리한 결과 각각 100, 105, 128, 105 및 64%의 세포 성장률을 나타내었다. 이 역시 당귀 열수 추출물 처리 결과와 같이 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도에서부터 세포 성장률이 감소하였다. 건지황 증숙 처리(100℃, 90분)후 열수 추출물, 건지황 증숙 처리(120℃, 90분)후 열수 추출물 역시 농도별 0, 0.5, 1, 2 및 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 처리한 결과 각각 100, 102, 122, 97 및 73%, 100, 101, 119, 118 및 73%의 세포 성장률을 나타내었고, 이 두 시료 모두 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이상의 농도에서부터 세포 성장률이 감소함을 볼 수 있었다.

[0078] 3) 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물의 SK-N-SH 신경 모세포에 대한 산화 방어 효과

[0079] 가. 산화 스트레스에 대한 효과

[0080] 표 3은 SK-N-SH 세포에 H₂O₂(250 μM)를 2시간 동안 처리하여 산화 스트레스를 유발하고 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 혼합물을 2시간 동안 처리한 후, 세포 생존력을 측정을 측정한 결과를 나타낸다. 이 때, 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 혼합물의 총 농도는 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 으로, 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 상대적 비율은 표 3에 나타난 바와 같다. 상기 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율은 측정하였고, 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 단칸의 다중범위 시험(Duncan's new multiple range test)을 이용하였으며, 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 유의차(significant difference) P<0.05이었다.

표 3

상대 비율(relative ratio)	세포 생존율(%)	
	당귀(<i>Angelica gigas</i> Nakai)	건지황(<i>Rehmannia glutinosa</i>)
10	0	141 $\pm$ 5
7	3	145 $\pm$ 6
5	5	154 $\pm$ 4
3	7	137 $\pm$ 3
0	10	130 $\pm$ 7

[0082] 표 3을 참조하면, 당귀의 열수 추출물과 건지황의 열수 추출물 혼합물 중 당귀의 열수 추출물과 건지황의 열수 추출물 1:1(w/w)로 혼합한 것이 산화 스트레스 억제 효과가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다.

[0083] 나. 유세포 분석에 의한 세포사멸(apoptosis) 및 세포 주기 억제(cell cycle arrest) 분석

[0084] 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1, w/w)과 H₂O₂ 처리 후 시간 경과에 따른 세포주기를 분석하였다. 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1, w/w) 처리에 의한 SK-N-SH 세포의 세포사멸 유발정도를 정량적으로 조사하기 위하여 PI 염색액을 이용하여 핵을 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 핵 내 DNA 함량을 비교 분석하였다.

[0085] 도 9 및 표 4는 SK-N-SH 신경모세포에 시료 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 을 2시간 동안 처리하고 난 후 H₂O₂를 2시간 처리한 다음, 세포를 회수하여 유세포 분석기로 세포주기의 각 기(phase)에 함유된 DNA 함량을 측정한 결과를 나타낸다. 아포토틱 세포(sub-G1 세포)는 대조군 처리에서는 14.5%였고, 처리 1시간 및 2시간 후에는 각각 19.4, 5.6%로 시간이 경과함에 따라 다소 증가했다가 감소하였다. 또한 처리 두 시간 후의 DNA 함량은 M 기(phase)가 21%로 0시간이나 1시간 후의 DNA 함량보다 높았다.

표 4

노출 시간(hr)	0		1		2	
기(phase)	총 세포수	총(%)	총 세포수	총(%)	총 세포수	총(%)
M1(Sub-G1: 아포토틱 세포)	1405	14.47	1855	19.40	521	5.69
M2(S)	4845	49.88	4816	50.37	4264	46.53
M3(G2)	1467	15.10	1491	15.59	1123	12.26
M4(M)	1171	12.06	941	9.84	1958	21.37

[0087] 도 10 및 표 5는 SK-N-SH 신경모세포에 시료를 농도별(0, 0.5, 1, 2 및 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 2시간 처리하고 난 후 H_2O_2 를 2시간 처리한 다음, 세포를 회수하여 유세포 분석기로 세포주기의 각 기에 함유된 DNA 함량을 측정한 결과를 나타낸다. 아포토틱 세포(sub-G1 세포)는 대조군 처리에서는 14.5%였고, 0.5, 1, 2 및 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 처리에서 각각 8.5, 6.4, 20.6 및 25.7%로 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 처리 농도에서 가장 적은 아포토틱 세포가 존재하였다. 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이상의 높은 농도에서는 아포토틱 세포가 많이 분포하여 세포독성이 있음을 의미한다. 상기 결과는 세포독성 결과와 일치하였다. 또한 M기에 많은 세포가 분포되어 있었다.

표 5

농도($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0		0.5		1		2		4	
마커	총 세포 수	총(%)	총 세포 수	총(%)	총 세포 수	총(%)	총 세포 수	총(%)	총 세포 수	총(%)
M1(Sub-G1)	1405	14.5	829	8.5	622	6.4	1995	20.6	2475	25.7
M2(S)	4845	49.9	5397	55.6	5497	56.4	4983	51.5	4648	48.3
M3(G2)	1467	15.1	1649	17	1849	19.0	1549	16.0	1367	14.2
M4(M)	1171	12.1	1842	18.9	1777	18.2	1151	11.9	1130	11.8

[0089] 다. Hoechst 33258 염색에 의한 세포사멸 확인

[0090] 아포토틱 세포의 형태학적 변화를 보여주기 위하여 형광현미경으로 관찰하였다(도 11 및 도 12 참조).

[0091] 도 11은 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1 w/w)을 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도로 2시간 처리하고 H_2O_2 처리시간에 따른 형태학적 변화를 형광현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다. 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1 w/w)이 처리되지 않은 배지(control)에서 자란 SK-N-SH 신경모세포가 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1 w/w)이 처리된 배지에서 자란 세포에 비하여 세포사멸 유발 특이적인 핵 내의 응축되거나 쪼개진 아포토시스소체(apoptotic body)가 많은 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 H_2O_2 처리 시간에 짧을수록 아포토시스소체가 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다.

[0092] 도 12는 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1 w/w)을 농도별(0, 0.5, 1, 2 및 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)로 2시간 처리하고 H_2O_2 를 2시간 처리에 따른 형태학적 변화를 형광현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다. 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물 혼합물(1:1 w/w)이 처리되지 않은 배지에서 자란 SK-N-SH 신경모세포가 한약재 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포에 비하여 세포사멸 유발 특이적인 핵 내의 응축되거나 쪼개진 아포토시스소체를 더 많이 관찰할 수 있었다. 그리고 시료 처리 농도에 따라서도 고농도(2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이상)로 처리한 경우 아포토시스소체가 많이 생겨, 0.5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 처리가 효과적임을 확인할 수 있었다.

[0093] 상기 결과를 통하여, 당귀 및 건지황의 열수 추출물, 에탄올 추출물, 증숙 처리 추출물 중 열수 추출물이 SK-N-SH 신경모세포를 산화 스트레스로부터 보호하는 효과가 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 열수 추출물 중 당귀와 건지황의 열수 추출물을 1:1로 혼합한 결과, 세포의 증식이나 세포사멸을 보호하는 효과가 우수한 것을 확인하였다. 따라서, 당귀 및 건지황의 열수 추출물의 혼합물은 인지능력 향상을 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0094] 실험예 3. 유효추출물의 화학적 분석

[0095] (1) 시료

[0096] 수분 함량 분석 및 휘발성 화합물 분석은 구입된 당귀 및 건지황을 시료로 사용하였다. 무기질 성분분석, 폴리페놀함량 측정, 항산화능 측정은 “실험예 1. 당귀와 건지황으로부터의 추출물의 분리”에서 조제된 에탄올 추출물 분말, 열수 추출물 분말을 시료로 사용하였다.

[0097] (2) 시료의 분석 방법 및 결과

[0098] 1) 수분 함량 분석

[0099] 가. 분석 방법

[0100] 컨테이너를 $105\pm3^{\circ}\text{C}$ 의 항온건조기 중에서 약 24시간 건조시켜 데시케이터에서 방랭 후에 정확하게 무게를 측정하고 컨테이너에 당귀 및 건지황을 넣고 $105\pm3^{\circ}\text{C}$ 의 항온건조기 중에서 약 24시간 건조 후, 데시케이터에 옮겨 방랭 하여 칭량한다. 수분 함량은 하기 수학적 식 2에 의하여 계산하였다.

[0101] [수학적 식 2]

[0102] $M=(S-L)/S\times 100$

[0103] 상기 식에서 M은 수분 함량(%), S는 시료의 건조중량(g), L은 여과 후 시료의 건조중량(g)을 나타낸다.

[0104] 나. 분석결과

[0105] 하기 표 6에 당귀 및 건지황의 수분 함량을 나타내었다. 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 단칸의 다중범위 실험을 이용하였으며, 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의차 $P<0.05$ 이었다.

표 6

[0106]	시료	수분함량(%)
	당귀	8.2 ± 0.4
	건지황	18.3 ± 1.8

[0107] 건지황의 수분 함량이 18.3%로 가장 높게 나타났고 당귀의 수분 함량이 8.2 %로 가장 낮게 나타났다.

[0108] 2) 휘발성 화합물 분석

[0109] 가. 분석 방법

[0110] 당귀 및 건지황을 절편하여 약 1.0g씩 HS 바이알(vial)에 담아서 15분간 가열 후 GC/MS에 헤드스페이스 샘플러(Headspace sampler turbomatrix 16)(PerkinElmer, USA)를 장착해서 분석 하였다. 헤드스페이스 샘플러 분석 조건은 오븐 온도는 125°C , 트랜스퍼 라인(transfer line) 온도는 100°C 이다.

[0111] GC/MS 분석 조건은 하기와 같다.

[0112] 인젝터(injector) 온도: 200°C

[0113] 캐리어 가스(Carrier gas): H_2 가스, $0.8\text{ml}/\text{분}$

[0114] 칼럼(Column): $30\text{m}\times 0.25\text{mm}\times 0.25\mu\text{m}$

[0115] 초기 칼럼 온도를 60°C 로 30분간 유지시키기 나서, 220°C 에 도달할 때까지 $3^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 속도로 승온 시키고, 상기 220°C 에서 3분 동안 유지시켰다.

[0116] 나. 분석 결과

[0117] i) 당귀의 휘발성 화합물 조성

[0118] 당귀의 가스 크로마토그램(gas chromatogram)을 도 13에 나타내었다. 당귀에는 3-카렌(3-Carene, 72.9%), α -피넨(α -Pinene, 8.6%), D-리보넨(D-Limonene, 8.7%)이 주성분으로 존재하였으며 대부분 모노테르펜(monoterpene) 및 세스퀴테르펜(sesquiterpene)으로 구성되어있는 것으로 나타났다. 당귀에 가장 많이 함유되어 있는 3-카렌 화합물은 지방질과 기름에 잘 혼합되며 감미로운 자극성 냄새를 나타내는 물질로 당귀 특유의 냄새는 3-카렌으로부터 유래되어진다고 판단된다. 당귀에 함유된 휘발성 화합물의 분자식과 함유비율을 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

번호	화합식	화합물	머무름 시간(retention time, 분)	%
1	C ₁₀ H ₁₆	3-카렌(3-Carene)	11.5	72.9
2	C ₁₀ H ₁₆	이소테르피놀렌(Isoterpinolene)	12.7	1.1
3	C ₁₀ H ₁₆	α-피넨(α-Pinene)	13.5	8.6
4	C ₁₀ H ₁₄	1-이소프로필-3-메틸벤젠(1-Isopropyl-3-methylbenzene)	14.9	0.4
5	C ₁₀ H ₁₆	D-리모넨(D-Limonene)	15.1	8.7
6	C ₁₀ H ₁₆	α-페란드렌(α-Phellandrene)	15.1	2.9
7	C ₁₅ H ₂₄	β-세드렌(β-Cedrene)	29.0	0.5
8	C ₁₅ H ₂₄	쥬요프센(Thujopsene)	29.5	0.4
9	C ₁₅ H ₂₄	α-파네센(α-Farnesene)	31.6	1.1
10	C ₁₅ H ₂₄	β-셀리넨(β-Selinene)	35.3	1.5
11	C ₁₅ H ₂₆ O	α-유데스몰(α-Eudesmol)	36.3	2.0

ii) 건지황의 휘발성 화합물 조성

건지황의 가스 크로마토그램을 도 14에 나타내었다. 건지황에는(1-메틸에틸리덴)사이클로부탄((1-Methylethylidene)cyclobutane, 6.3%), 4-메틸사이클로헥산올(4-Methylcyclohexanol, 6.2%), 벤즈알데히드(Benzaldehyde, 7.1%), 이소프탈알데히드(Isophthalaldehyde, 8.6%), 5,5-디메틸-1,3-사이클로펜타디엔(5,5-Dimethyl-1,3-cyclopentadiene, 48.6%)이 주성분으로 존재하였다. 건지황에 함유된 휘발성 화합물의 분자식과 함유비율을 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

번호	화합식	화합물	머무름 시간(분)	%
1	C ₇ H ₁₂	(1-메틸에틸리덴)사이클로부탄((1-Methylethylidene)cyclobutane)	3.8	6.3
2	C ₇ H ₈	스피로[2,4]헵타-4,6-디엔(Spiro[2,4]hepta-4,6-diene)	5.5	4.0
3	C ₆ H ₉ N	3-에틸-1H-피롤(3-Ethyl-1H-pyrrole)	6.8	3.4
4	C ₇ H ₁₄ O	4-메틸사이클로헥산올(4-Methylcyclohexanol)	10.1	6.2
5	C ₇ H ₆ O	벤즈알데히드(Benzaldehyde)	12.5	7.1
6	C ₉ H ₁₆ O	2,2,6-트리메틸사이클로헥사논(2,2,6-Trimethylcyclohexanone)	15.2	4.0
7	C ₈ H ₁₂ N ₂	2,3-디메틸-5-에틸피라진(2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine)	17.3	4.2
8	C ₇ H ₈ O	m-크레졸(m-Cresol)	21.4	4.5
9	C ₁₀ H ₁₂ O	아네톨(Anethol)	21.6	3.0
10	C ₈ H ₆ O ₂	이소프탈알데히드(Isophthalaldehyde)	36.1	8.6
11	C ₇ H ₁₀	5,5-디메틸-1,3-사이클로펜타디엔(5,5-Dimethyl-1,3-cyclopentadiene)	37.2	48.6

3) 무기질 성분 분석

가. 분석 방법

당귀 및 건지황의 에탄올 및 열수 추출 분말 1g을 습식분해액(HNO₃:H₂SO₄:HClO₄ = 10:1:4) 25ml로 여과시킨 후 와트만(Whatman) 여과지를 이용하여 잔사를 분리하고 여액은 최종적으로 100ml이 되게 희석한다. 희석액은 ICP

분광기(spectrometer)를 이용하여 함유된 칼슘, 인, 철, 나트륨 등 10가지의 미량성분 함량을 정량한다. 측정된 미량성분의 농도(mg/ℓ)는 전건 중량의 시료 무게를 감안하여 하기 수식식 3을 통해 원소의 함량(mg/g)을 계산하였다.

[0126] [수식식 3]

[0127] $M=(C \times V)/M_s$

[0128] 상기 식에서, M은 원소의 함량(mg/g), C는 측정된 미량성분의 농도(mg/ℓ), V는 분해된 용액의 최종부피(ml), Ms는 시료의 전건 중량(g)을 나타낸다.

[0129] 나. 분석결과

[0130] 하기 표 9에 당귀 및 건지황으로부터 추출된 에탄올 추출물과 열수 추출물의 무기질 성분 분석 결과를 나타내었다. 무기질 조성물, mg/g는 건조 중량을 기초로 계산한 값이며, 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 던칸의 다중범위 시험을 이용하였으며, 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의차P<0.05이었다.

[0131] 열수 추출물이 에탄올 추출물보다 무기질 성분의 함량이 높았으며 에탄올 추출물에서는 칼륨을 제외한 무기질의 함량이 0.5mg/g 이하로 나타났다. 각각의 시료에서 칼륨의 양이 다른 무기질에 비해 가장 많이 나타났고 나트륨, 망간, 알루미늄, 철, 아연, 구리의 함량은 0.1-0.4mg/g로 나타났다. 당귀 열수 추출물에서 칼륨이 40.2 mg/g, 인 함량 역시 15.3mg/g로 높게 나타났다.

표 9

시료		무기질 조성물, mg/g									
		Ca	Mg	K	Na	Mn	Al	Fe	Zn	Cu	P
열수 추출물	당귀	0.2 ±0.0	0.1 ±0.0	7.1 ±0.1	0.2 ±0.0	0.1 ±0.0	0.2 ±0.0	0.3 ±0.0	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0	0.4 ±0.0
	건지황	0.5 ±0.0	0.1 ±0.0	4.5 ±0.0	0.3 ±0.0	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0	0.2 ±0.0	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0	0.2 ±0.0
에탄올 추출물	당귀	2.8 ±0.0	5.1 ±0.1	40.2 ±0.6	0.3 ±0.0	0.1 ±0.0	0.3 ±0.0	0.3 ±0.0	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0	15.3 ±0.2
	건지황	0.4 ±0.0	0.7 ±0.0	7.0 ±0.1	0.3 ±0.0	0.2 ±0.0	0.1 ±0.0	0.2 ±0.0	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0	1.4 ±0.0

[0133] 4) 폴리페놀 함량 분석

[0134] 가. 분석 방법

[0135] 당귀 및 건지황의 에탄올 및 열수 추출 분말 약 0.1g을 증류수 1ml과 혼합한 후 이 추출물 30μℓ에 3ml의 증류수를 첨가하고 Folin-Ciocalteu's phenolic reagent 2N 시약 100μℓ를 혼합하여 5분간 실온에서 반응시킨 후 20% Na₂CO₃ 용액 300μℓ를 첨가하여 잘 혼합시켜 실온에서 30분간 반응시키고 UV(U-3000 Spectrophotometer)로 765nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 갈산(gallic acid)을 이용하여 작성하였다.

[0136] 나. 분석 결과

[0137] 하기 표 10은 당귀 및 건지황으로부터 추출된 에탄올 추출물과 열수 추출물에 함유된 폴리페놀 함량을 나타낸다. 폴리페놀 함량, mg/g는 건조 중량을 기초로 계산한 값이며, 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 던칸의 다중범위 시험을 이용하였으며, 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의차 P<0.05이었다. 당귀는 열수 추출물에서 건지황에서는 에탄올 추출물이 폴리페놀 함량이 높게 나타났다.

표 10

시료	폴리페놀 함량, mg/g	
	에탄올 추출물	열수 추출물
당귀	34.0±6.7	36.9±2.1
건지황	13.5±0.7	5.6±1.9

[0139] 5) 항산화능 분석

[0140] 가. 분석 방법

[0141] 당귀 및 건지황의 에탄올 및 열수 추출 분말 0.1g에 해당하는 부피를 메탄올에 희석하여 5ml로 부피를 보정 하여 항산화활성실험에 시료로 사용하였으며, 비교구로는 BHT(Butylated hydroxyanisole)를 사용하여 추출물의 활성과 비교하였다. 항산화 활성은 Blois법에 의하여 측정하였다(Elmastasa et al., 2007). 즉, 96 웰에 1.5×10^{-4} M농도의 DPPH(diphenylpicrylhydrazyl) 용액 $200 \mu\text{l}$ 와 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 농도의 시료 $10 \mu\text{l}$ 를 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 후 eliser-reader(anthos- 2020 anthos labtec. instruments)를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화활성, %는 하기 수식 4에 의하여 계산하였다.

[0142] [수식 4]

[0143] $A=1-(S/C) \times 100$

[0144] 상기 식에서, A는 항산화활성(%), S는 시료의 흡광도(abs), C는 대조군의 흡광도(abs)를 나타낸다.

[0145] 나. 분석 결과

[0146] 하기 표 11에 당귀 및 건지황으로부터 추출된 에탄올 추출물과 열수 추출물을 사용하여 항산화 활성을 측정하여 나타내었다. 항산화활성, %는 건조 중량을 기초로 계산한 값이며, 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 단칸의 다중범위 시험을 이용하였으며, 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의차) $P < 0.05$ 이었다. 당귀는 열수 추출물에서 건지황에서는 에탄올 추출물이 항산화활성이 높게 나타났다.

표 11

[0147]

시료	항산화활성, %	
	에탄올 추출물	열수 추출물
당귀	88.6 ± 0.2	90.1 ± 0.2
건지황	83.2 ± 0.5	76.6 ± 0.3
BHT	91.5 ± 0.3	

[0148] 6) 탄수화물 함량 분석

[0149] 가. 분석 방법

[0150] 당귀 및 건지황의 에탄올 및 열수 추출 분말을 $10 \text{ mg} / \text{ml}$ 의 농도로 3차 증류수에 넣고 35°C 에서 1시간 동안 초음파 처리(Sonication)시켜 추출한 뒤 $0.22 \mu\text{m}$ 필터를 이용하여 녹지 않은 성분을 여과하였다. 테스트 튜브에 시료 $250 \mu\text{l}$, 진한황산(conc. H_2SO_4) $750 \mu\text{l}$, 5% 페놀 $250 \mu\text{l}$ 를 넣고 혼합(vortexing)하여 95°C 항온조에 5분 동안 방치한 후 실온에서 5분 동안 식혀주고 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 1% 글루코스 용액을 이용하여 작성하였다.

[0151] 나. 분석 결과

[0152] 하기 표 12에 당귀 및 건지황의 탄수화물 함량을 나타내었다. 탄수화물 함량, mg / g 는 건조 중량을 기초로 계산한 값이며, 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 단칸의 다중범위 시험을 이용하였으며, 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의차 $P < 0.05$ 이었다. 건지황은 열수 추출물에서 당귀에서는 에탄올 추출물이 탄수화물 함량이 높게 나타났다.

표 12

[0153]

시료	탄수화물 함량, mg / g	
	에탄올 추출물	열수 추출물
당귀	126.3 ± 4.9	123.4 ± 2.1
건지황	122.9 ± 4.0	126.2 ± 0.4

[0154] 7) 조단백질 함량 분석

[0155] 가. 분석 방법

[0156] 당귀 및 건지황의 에탄올 및 열수 추출 분말을 10mg/ml의 농도로 3차 증류수에 넣고 35℃에서 1시간 동안 초음파 처리시켜 추출한 뒤 0.22 μ m 필터를 이용하여 녹지 않은 성분을 여과하였다. E-tube에 시료 10 μ l, 3차 증류수 90 μ l, 1 Bradford 용액 900 μ l를 넣고 혼합하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 0.1% BSA 용액을 이용하여 작성하였다.

[0157] 나. 분석 결과

[0158] 하기 표 13에 당귀 및 건지황의 조단백질 함량을 나타내었다. 조단백질 함량, mg/g는 건조 중량을 기초로 계산한 값이며, 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 단칸의 다중범위 시험을 이용하였으며, 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 유의차 P<0.05이었다. 당귀는 열수 추출물에서 건지황에서는 에탄올 추출물이 조단백질 함량이 높게 나타났다.

표 13

시료	조단백질 함량, mg/g	
	에탄올 추출물	열수 추출물
당귀	34.8 $\pm$ 0.6	160.0 $\pm$ 1.9
건지황	42.6 $\pm$ 5.7	31.1 $\pm$ 4.4

[0160] 8) 조지방 함량 분석

[0161] 가. 분석 방법

[0162] 당귀 및 건지황의 에탄올 및 열수 추출 분말 0.5g을 원통여과지(Thimble filter)에 넣고 속슬렛(Soxhlet) 추출 장치를 이용하여 클로로포름(Chloroform) 150ml로 6시간 동안 75℃에서 추출한 뒤 증류농축장치(Rotary Evaporator)를 이용하여 클로로포름을 모두 제거하고 남은 지방의 무게를 측정하였다.

[0163] 나. 분석 결과

[0164] 하기 표 14에 당귀 및 건지황의 조지방 함량을 나타내었다. 조지방 함량, mg/g는 건조 중량을 기초로 계산한 값이며, 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 단칸의 다중범위 시험을 이용하였으며, 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 유의차 P<0.05이었다. 건지황은 열수 추출물에서 당귀에서는 에탄올 추출물이 조지방 함량이 높게 나타났다.

표 14

시료	조지방 함량, mg/g	
	에탄올 추출물	열수 추출물
당귀	573.2 $\pm$ 11.2	109.4 $\pm$ 8.2
건지황	61.3 $\pm$ 4.5	117.2 $\pm$ 6.4

[0166] 9) 조회분 함량 분석

[0167] 가. 분석 방법

[0168] 당귀 및 건지황의 에탄올 및 열수 추출 분말 1g을 도가니에 담고 800℃ 회화로에 4시간 동안 방치하여 회분 함량을 측정하였다.

[0169] 나. 분석 결과

[0170] 하기 표 15에 당귀 및 건지황의 조회분 함량을 나타내었다. 조회분 함량, mg/g는 건조 중량을 기초로 계산한 값이며, 3번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 단칸의 다중범위 시험을 이용하였으며, 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 유의차 P<0.05이었다. 당귀 및 건지황 모두에서 에탄올 추출물 보다 열수 추출물에서 조회분 함량이 높게 나타났으며, 특히 당귀에서 열수 추출물의 함량 차이가 크게 나타났다.

표 15

시료	조회분 함량, mg/g	
	에탄올 추출물	열수 추출물

당귀	1.3±0.2	116.1±3.4
건지황	1.9±0.7	9.2±0.2

[0172] 실시예. 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료 및 이의 제조

[0173] <실시예 1>

[0174] “실시예 1. 당귀와 건지황으로부터의 추출물의 분리” 부분에서 상술한 방법에 따라 제조한 당귀 열수 추출물, 건지황 열수 추출물을 시료로 하였다. 음료베이스로는 프락토올리고당 액상, 프락토올리고당 분말, 대추향을 음료베이스로 이용하였다. 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료는 당귀열수추출물 분말, 건지황 열수 추출물 분말을 각각 멸균수에 녹여 1 Brix 농도로 조절한 다음 이를 1:1(w/w)로 혼합하였고, 상기 혼합액을 85.25g, 프락토올리고당 액상 약 11.62g, 프락토올리고당 파우더 약 2.68g, 대추향 약 0.45g (표 16 참조)를 혼합하여 제조하였다.

표 16

[0175]

시료	합량, %(w/w)
당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 1:1(w/w) 혼합물	85.25
프락토올리고당 액상(Fructo-oligosaccharide liquid)	11.62
프락토올리고당 파우더(Fructo-oligosaccharide powder)	2.68
대추향(향료)	0.45

[0176] <실시예 2>

[0177] 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료는 당귀열수추출물 분말, 건지황 열수 추출물 분말을 각각 멸균수에 녹여 1 Brix 농도로 조절한 다음 이를 1:1(w/w)로 혼합하였고, 상기 혼합액을 83.25g, 프락토올리고당 액상 약 12.62g, 프락토올리고당 파우더 약 2.68g, 대추향 약 1.45g (표 17 참조)를 혼합하여 제조하였다.

표 17

[0178]

시료	합량, %(w/w)
당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 1:1(w/w) 혼합물	83.25
프락토올리고당 액상(Fructo-oligosaccharide liquid)	12.62
프락토올리고당 파우더(Fructo-oligosaccharide powder)	2.68
대추향(향료)	1.45

[0179] <실시예 3>

[0180] 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료는 당귀열수추출물 분말, 건지황 열수 추출물 분말을 각각 멸균수에 녹여 1 Brix 농도로 조절한 다음 이를 1:1(w/w)로 혼합하였고, 상기 혼합액을 83.25g, 프락토올리고당 액상 약 15.42g, 프락토올리고당 파우더 약 0.83g, 대추향 약 0.50g (표 18 참조)를 혼합하여 제조하였다.

표 18

[0181]

시료	합량, %(w/w)
당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 1:1(w/w) 혼합물	83.25
프락토올리고당 액상(Fructo-oligosaccharide liquid)	15.42
프락토올리고당 파우더(Fructo-oligosaccharide powder)	0.83
대추향(향료)	0.50

[0182] <실시예 4>

[0183] 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료는 당귀열수추출물 분말, 건지황 열수 추출물 분말을 각각 멸균수에 녹여 1 Brix

농도로 조절한 다음 이를 1:1(w/w)로 혼합하였고, 상기 혼합액을 90.25g, 프락토올리고당 액상 약 9.02g, 프락토올리고당 파우더 약 0.58g, 대추향 약 0.15g (표 19 참조)를 혼합하여 제조하였다.

표 19

[0184]

시료	함량, %(w/w)
당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 1:1(w/w) 혼합물	90.25
프락토올리고당 액상(Fructo-oligosaccharide liquid)	9.02
프락토올리고당 파우더(Fructo-oligosaccharide powder)	0.58
대추향(향료)	0.15

[0185]

실험예 4. 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료의 관능평가

[0186]

실시에 1 내지 실시예 4에 따라 제조된 음료에 대한 관능검사는 기능성 음료음용 비율이 높은 20~30대 대학생 및 대학생 패널요원 30명(남성 15명, 여성 15명)을 모집하여 실시하였으며, 음료의 맛(Taste), 향(Flavor), 색(Color), 종합적인 기호도(Overall acceptability)를 평가하였다. 평가 방법은 7점 채점법으로 아주 나쁘다(1점), 나쁘다(2점), 조금 나쁘다(3점), 보통이다(4점), 조금 좋다(5점), 좋다(6점), 아주 좋다(7점)로 실시하였다. 상기 실험예 4의 결과는 하기 표 20과 같다.

표 20

[0187]

관능 평가	실시에 1	실시에 2	실시에 3	실시에 4
맛	6.0±0.2	5.5±0.2	5.4±0.3	5.0±0.7
향	6.2±0.3	5.2±0.7	5.0±0.5	4.9±0.5
색	6.1±0.5	5.8±0.3	5.7±0.4	5.6±0.2
종합적인 기호도	6.3±0.2	5.6±0.4	5.4±0.3	5.1±0.4

[0188]

실시에 2 및 3의 경우 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 1:1(w/w) 혼합물의 함량이 실시예 1에 비해 비교적 적게 함유되어 있어 한약재 고유의 독특한 향미의 맛의 조화가 실시예 1보다 낮은 것으로 조사되었다. 또한, 실시예 4의 경우 당귀 열수 추출물과 건지황 열수 추출물의 1:1(w/w) 혼합물의 함량이 높아, 당귀의 고유의 쓴 맛이 강하여 맛과 양에 대한 평가가 실시예 1이 높은 것으로 조사되었다. 따라서, 실시예 1의 당귀와 건지황을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선용 기능성 음료가 가장 한약재 고유의 독특한 향미의 맛의 조화가 높고, 당귀의 고유의 쓴맛을 개선하여 기호성이 가장 높은 것으로 평가되었다.

[0189]

실험예 5. 당귀와 건지황으로부터의 열수추출물의 추출 방식에 따른 효율성 평가

[0190]

당귀와 건지황으로부터의 열수추출물의 추출 방식에 따른 효율성을 평가하였다. 국내산 당귀(*Anjelica gigas*) 및 건지황(*Rehmannia glutinosa*)은 경남생약농협(경남 산청군 금서면 특리 1300-1)에서 구입하여 시료로 사용하였다. 각각의 추출물의 함량은 상기 수학적 식 1에 의하여 계산하였다.

[0191]

(1) 추출물의 분리 및 조제

[0192]

가. 환류냉각 방식(Allihn condenser type)에 의한 추출

[0193]

칭량병 및 유리여과기(2G3)를 미리 칭량하고 정칭한 당귀, 건지황 4g을 둥근바닥플라스크에 넣어 증류수 600ml을 가한다. 플라스크에 환류냉각기를 부착하여 히팅 맨틀에서 5시간 동안 끓이고 그 다음에 유리여과기에서 여과 후 에탄올로 세정하고 추출잔류물이 들어 있는 유리여과기를 칭량병으로 옮겨 항온건조기 105±3℃에서 24시간 건조 후 데시케이터내에서 방랭 하여 칭량한다.

[0194]

나. 마이크로파 방식(Microwave type)에 의한 추출

[0195]

칭량병 및 유리여과기(2G3)를 미리 칭량함 정칭한 당귀, 건지황 4g을 둥근바닥 플라스크에 넣어 증류수 600ml을 가한 뒤 환류냉각기가 부착된 마이크로파 장치에서 5시간 동안 끓이고 그 다음에 유리여과기에서 여과 후 증류수로 세정한다. 추출잔류물이 들어 있는 유리여과기를 칭량병으로 옮겨 항온건조기 105±3℃에서 24시간 건조 후 데시케이터 내에서 방랭 하여 칭량한다.

[0196] 다. 고온(고압) 방식(autoclave type)에 의한 추출

[0197] 칭량병 및 유리여과기(2G3)를 미리 칭량함 정칭한 당귀, 건지황 4g을 삼각 플라스크에 넣어 증류수 600ml을 가한 뒤 고온(고압)추출 장치에서 5시간 동안 끓이고(약 120℃, 약 1.5kg/cm²) 그 다음에 유리여과기에서 여과 후 증류수로 세정한다. 추출잔류물이 들어 있는 유리여과기를 칭량병으로 옮겨 항온건조기 105±3℃에서 24시간 건조 후 데시케이터 내에서 방랭 하여 칭량한다.

[0198] (2) 결과

[0199] 표 21은 당귀 및 건지황의 추출 방식에 따른 추출물 함량을 나타낸다.

[0200] 당귀에서는 추출 방식에 따라 수율차이가 크게 나타났으며 고온(고압) 방식으로 추출했을 때 추출물의 함량이 72.8%로 환류냉각 방식(32.4%)과 마이크로파 방식(57.7%)으로 추출했을 때 보다 높은 수율을 나타냈다. 건지황에서는 환류냉각 방식과 마이크로파 방식으로 추출했을 때 추출물 함량은 각각 73.5%, 70.6%로 유사한 수치를 나타냈으며 고온(고압) 방식으로 추출했을 때의 추출물의 함량은 88.9%로 환류냉각방식과 마이크로파 방식으로 추출했을 때 보다 높은 수율을 나타냈다. 따라서, 당귀와 건지황에 있어서 다량의 추출물 확보를 위한 최적추출법은 고온(고압) 방식에 의한 추출법임을 확인할 수 있었다.

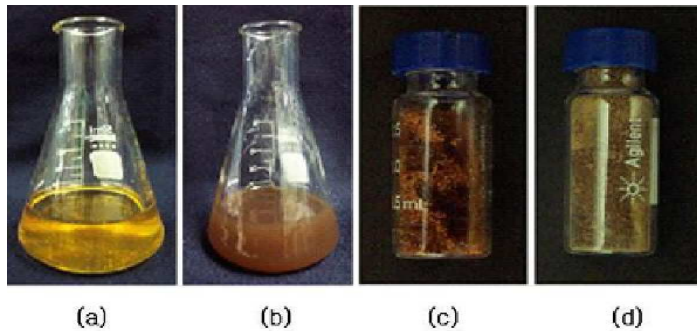
표 21

[0201]

추출 방식	추출물(%)	
	당귀	건지황
환류냉각 방식(Allihn condenser type)	32.4±3.1	73.5±0.4
마이크로파 방식(Microwave type)	57.7±0.2	70.6±0.3
고온(고압) 방식(Autoclave type)	72.8±0.8	88.9±0.4

도면

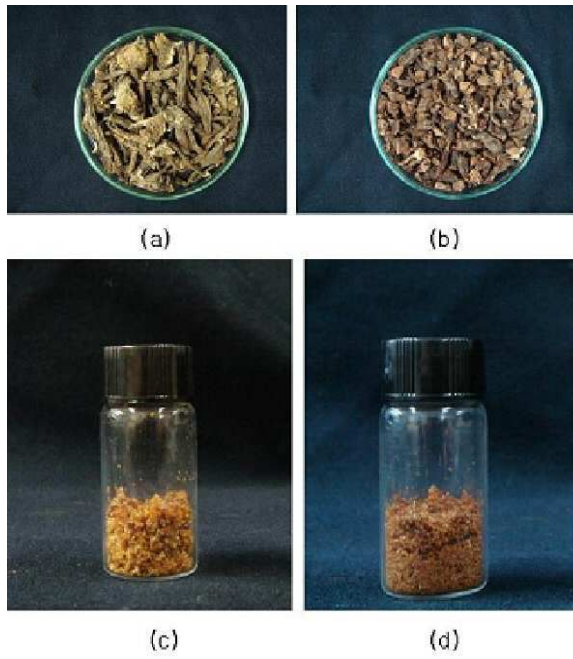
도면1



도면2



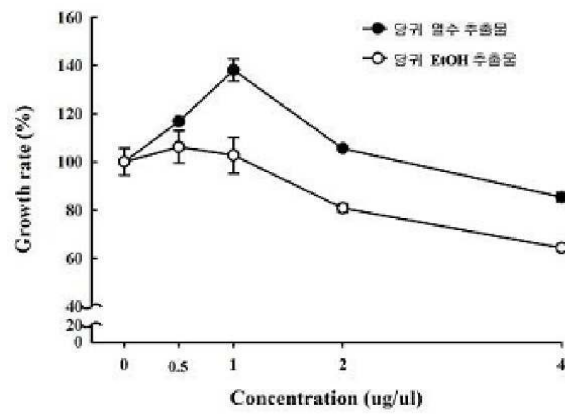
도면3



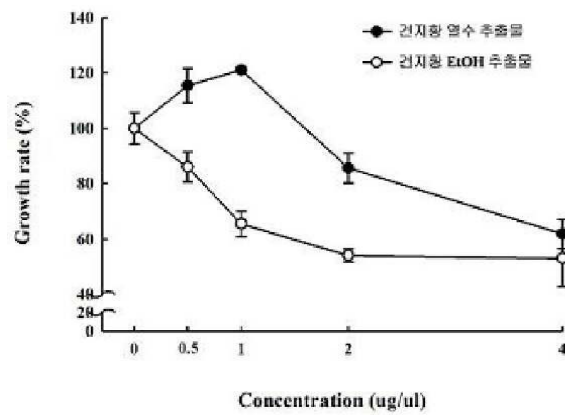
도면4



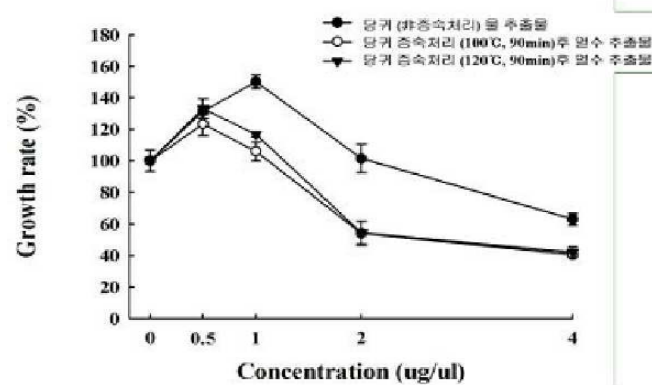
도면5



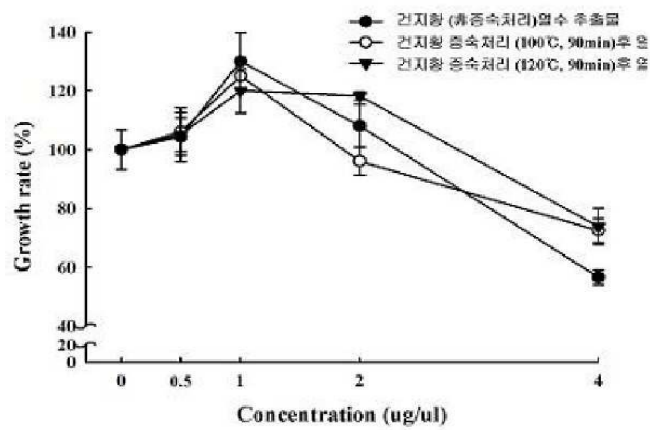
도면6



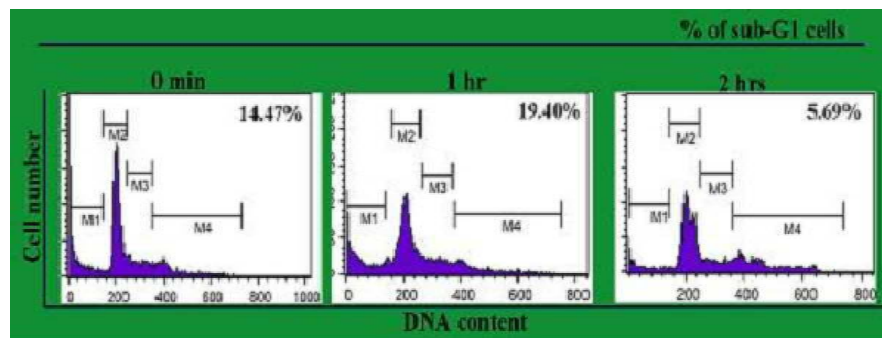
도면7



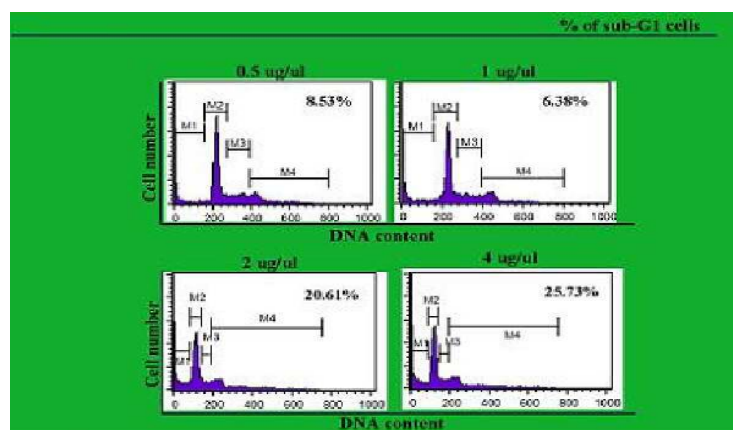
도면8



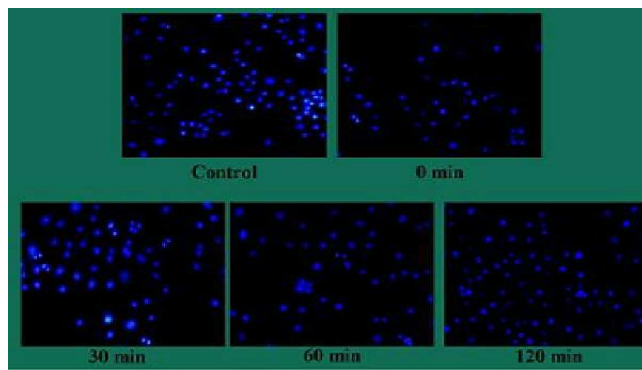
도면9



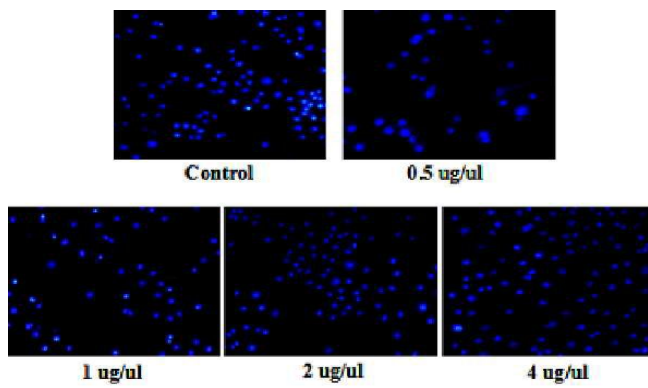
도면10



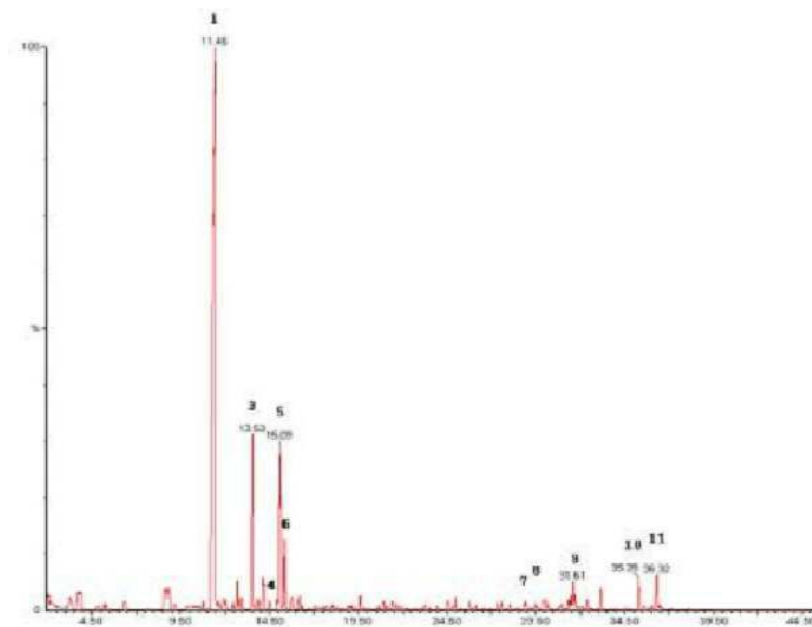
도면11



도면12



도면13



도면14

