



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0129370

(43) 공개일자

2012년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/68 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2011-0047584

(22) 출원일자

2011년05월19일

심사청구일자

2011년05월19일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이광원

경기도 성남시 분당구 양현로 220, 삼환아파트
1104동 1901호 (이매동)

홍충의

서울특별시 동대문구 안암로20가길 13, 1층 (제기
동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김선애

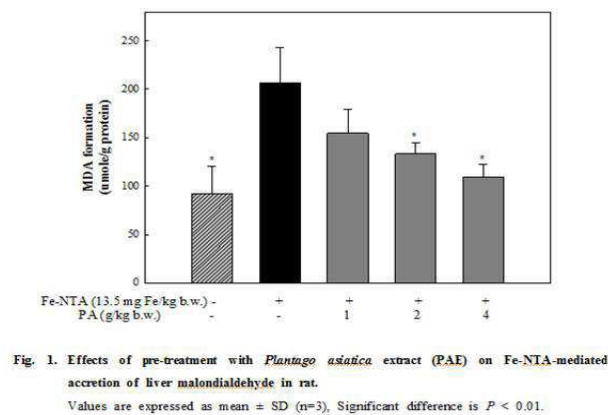
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 차전초 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 차전초 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 장애 예방, 치료 또는 개선용 약제학적 조성물 및 건강기능성 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 본 발명에 의한 차전초 추출물은 부작용 및 독성 발현율이 극히 낮고 생체 친화적이며 Fe-NTA 등 산화스트레스에 의한 간 기능 장애의 예방, 치료 또는 개선에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

손다희

서울특별시 성북구 개운사1길 32, 305호 (안암동5가)

전수현

서울특별시 송파구 송이로 36, 각산@ 701호 (송파동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109140032SB010

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 [주관] 차전초 추출물의 기능성 검증 및 표준화 연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.10 ~ 2011.04.09

특허청구의 범위

청구항 1

차전초 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 간 기능 장애는 Fe-NTA(Ferric nitrilotriacetate)에 의해 유발된 것임을 특징으로 하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 차전초 추출물은 플란타마조사이드를 활성성분으로 포함하는 것을 간 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 플란타마조사이드는

- i) 차전초의 알콜 추출물을 수득하여 분말화하는 단계;
- ii) 상기 단계 i)에서 얻어진 분말을 물에 녹인 후 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올을 순서대로 이용하여 극성에 따라 순차적으로 추출하는 단계; 및
- iii) 상기 단계 ii)에서 수득한 부탄올 분획물을 겔 여과 크로마토그래피를 수행하여 플란타마조사이드를 수득하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻어진 간 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

상기 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 조성물을 포함하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 조성물을 포함하는 간 기능 장애 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 차전초 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 부작용이 전혀 없고 안전성이 확보되며 효능이 우수한 차전초 추출물 및 그로부터 분리한 플란타마조사이드(plantamajoside) 등을 유효성분으로 함유하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

현대사회는 환경이나 식습관, 또는 생활방식에 의해 여러 종류의 산화스트레스에 노출되어 있다. 이러한 산화스트레스는 환경에서 유출되는 많은 종류의 공해물질, 지방 성분이 많거나 과도한 조리 조건에 의해 생성되는 식품 부산물들, 그리고 사회생활을 통한 정신적 스트레스들에 의해서 발생한다. 산화스트레스에 의해 생체 내에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 또는 자유라디칼(free radical)이라고 불리는 반응성이 큰 물질들이 과도하게 생성되고, 이렇게 생성된 ROS 들은 독성, 즉 산화적 손상(oxidative stress)을 야기하게 된다. ROS 들은 단백질이나 DNA 손상을 유발하여 산화적 세포손상을 초래하고(Fridovich, I., *Arch. Biochem. Biophys.*,

247, 1-15, 1986), 그로 인해 파킨슨병(Farooqui, T. and Farooqui, A.A., *Parkinson Dis.*, in process, 2011), 알츠하이머병(Jomova, K. *et al.*, *Cell Biochem.*, **345**, 91-104, 2010), 2형 당뇨병(Garcia-Bailo, *et al.*, *Biologics*, **5**, 7-19, 2011) 등 많은 질병의 원인이 된다.

[0003] 또한, Hata 등(*Life Sciences* **60**, 2221-2230, 1997)은 식품 소비를 통해 체내 철 이온의 농도가 증가하고, 증가된 철 이온은 Fenton reaction을 통해 ROS를 생성한다고 보고하였으며, Iqbal(M. *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **212**, 557-563, 1995)은 ROS가 간질환의 병리학적 과정에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. Fe-NTA(Ferric nitrilotriacetate)는 철 이온과 NTA의 복합체로 NTA는 산업체에서 킬레이트 화합물로 사용하거나 회토류금속을 분리할 때 등 많은 분야에서 쓰이고 있으며, 병원 또는 일반 가정에서 사용하는 세제 속에 많이 포함되어 상수도 오염의 주범이 된다(Anderson, R.L. *et al.*, *Crit. Rev. Toxicol.*, **15**, 1-102, 1985). 이런 NTA는 물에 잘 녹을 뿐 아니라 중성의 pH에서 여러 금속이온들과 반응하여 다양한 복합체를 형성한다. 특히 철 복합체인 Fe-NTA는 몸 안에 들어오게 되면 간에서 제일 처음 대사되며, 이로 인해 iron-induced oxidative stress를 유발해 간독성을 일으키며 간 기능 저하라든지 간 손상 및 많은 간 관련 질병과 연관이 되어있다는 보고들이 나오고 있다(Deiana, M. *et al.*, *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 2434-2440, 2007; Khan, N. and Sultana, S., *Chemico-Biological Interactions*, **149**, 23-35, 2004; Iqbal, M. *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **212**, 557-563, 1995; Athar, M. and Iqbal, M., *Carcinogenesis*, **19**, 1133-1139, 1998).

[0004] 상술한 바와 같이 현대사회의 다양한 산화적 스트레스 영향으로, 종래의 간 기능 장애 치료제와 동등하거나 그 이상의 효능을 나타내면서도 인체에 대해서는 좀 더 안전한 새로운 간 기능 장애 예방, 치료 또는 개선용 물질을 개발해야 할 필요성이 계속적으로 대두되고 있다.

[0005] 한편, 차전초(*Plantago asiatica*)는 차전초과에 속하는 다년생 식물로 한국이나 중국, 일본 등지에 자생하며 오래전부터 민간요법으로 많이 이용이 되어 왔다. 차전초는 간보호, 항염증(Turel, I. *et al.*, *Indian J. Pharma.*, **41**(3), 120-124, 2009), 항산화 활성(Yin, J.N. *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, **90**(2), 210-217, 2010; Choi, S.Y. *et al.*, *Phytother. Res.*, **22**, 323-329, 2008)이 보고되었으며, 차전초부터 분리된 플란타마조사이드(plantamajoside)의 항산화와 항글라이케이션 효과에 대해서도 본 발명자들에 의해서 보고되었다(Choi, S.Y. *et al.*, *Phytother. Res.*, **22**, 323-329, 2008). 차전초에서 분리된 활성물질로는 플란타마조사이드(plantamajoside, Komoda, Y. *et al.*, *Tokyo Ika Shika Daigaku Iuo Kizai Kenkuisho Hokoku*, **23**, 81-85, 1989), 페닐에타노이드(phenylethanoids, Murai, M. *et al.*, *Planta Med.*, **61**, 479-480, 1995), 플란타기닌(plantagin, Aritomi, M., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **15**, 432-434, 1967), 아세토사이드(acetoside), 플라보노이드(flavonoid, Nishibe, S., *Yakugaku Zasshi*, **122**, 363-379, 2002) 등이 있으며, 차전초의 안전성은 본 발명자들이 단회와 14일, 90일 반복투여 독성시험을 통한 일반독성과 복귀돌연변이 및 염색체 이상시험을 통한 유전독성 평가를 실시하여 안전성을 확인하였다(Park, B.G. *et al.*, *J. Toxicol. Pub. Health*, **23**(1), 79-86, 2007; Park, B.G. *et al.*, *Phytother. Res.*, **21**, 1118-1123, 2007; Koo, Y.C. *et al.*, *Res.*, **23**, 1479-1481, 2009).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 독성 및 부작용이 전혀 없어 안전성이 확보되면서도 우수한 간 기능 장애 치료/예방 효과를 나타내는 소재를 천연물로부터 개발하고자 연구를 거듭하였으며, 그 결과, 우리나라 전역에 다량 서식하나 크게 활용되지 못하고 있었던 차전초 또는 그로부터 분리된 플란타마조사이드의 우수한 간 기능 장애 치료 효능을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 독성 및 부작용이 전혀 없으며 효능이 우수한, 차전초 추출물 또는 그로부터 분리된 플란타마조사이드를 유효성분으로 함유하는 간 기능 장애 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 함유하는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 함유하는 건강기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기한 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 일 측면에 따르면, 본 발명은 차전초의 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 본 발명은 차전초 추출물을 유효성분으로 함유하는 상기 조성물을 포함하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 일 측면에 따르면, 본 발명은 차전초 추출물을 유효성분으로 함유하는 상기 조성물을 포함하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0014] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0015] 본 발명자들은 차전초를 주정 에탄올을 사용하여 추출하였고, Fe-NTA에 의한 간 기능 장애에 대한 개선효과를 확인하고 본 발명을 완성하였다(표 1, 2 및 도1).

[0016] 따라서 본 발명은 차전초 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 장애 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물 또는 건강기능성 식품 조성물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 본 발명에서, 간 기능 장애란, 정상 상태에 비해 간의 기능이 저하되어 간이 정상적으로 작동할 수 없게 되는 것 또는 그렇게 된 상태를 의미한다. 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명은 Fe-NTA 등 산화스트레스에 의한 간 기능 저하라든지, 간 손상 등에 기초하는 ALT(alanine aminotransferase)와 AST(aspartate aminotransferase) 증가와 관련된 간 기능 장애의 예방 또는 치료에 특히 효과적이다.

[0019] 본 발명에 있어서, 추출물에는, 추출, 분획 및 정제 처리의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그 회석액 또는 농축액, 또는 그 건조물 중 어느 하나라도 포함하는 것으로 한다. 바람직하게는 상기 추출물은 플란타마조사이드를 활성성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 추출용매는 물, 탄소 수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 것이 바람직하고, 상기 추출은 70% 에탄올을 용매로 사용하여 추출된 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0021] 상기 알코올 추출물은 극성이 다른 유기용매를 이용하여 더욱 분획할 수 있으며, 각종 크로마토그래피를 이용하여 더욱 정제할 수도 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명자들의 특허 등록 제10-0839185호 및 제10-0741350호에 기재된 방법에 의해 분획 및 추출할 수 있다.

[0022] 이에 한정되는 것은 아니나 본 발명에 있어 차전초 추출물은 상기 방법에 따라 분리된 플란타마조사이드(plantamajoside, Komoda, Y., *et al.*, *Tokyo Ika Shika Daigaku Iuo Kizai Kenkuisho Hokoku*, **23**, 81-85, 1989), 페닐에타노이드(phenylethanoids, Murai, M. *et al.*, *Planta Med.*, **61**, 479-480, 1995), 플란타기닌(plantaginins, Aritomi, M., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **15**, 432-434, 1967), 아세토사이드(acetoside), 플라보노이드(flavonoid, Nishibe, S., *Yakugaku Zasshi*, **122**, 363-379, 2002) 등을 포함할 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명에 있어 차전초 추출물은 항산화 효과가 우수한 플란타마조사이드를 활성성분으로 포함하는 것이 바람직하다.

[0023] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 유기 용매 추출은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 및 부탄올의 순서로 수행될 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 분획물 중 부탄올 분획물은 실리카 겔 60 또는 sepalex LH-20 컬럼 등 공지의 기술을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 조성물은 크로마토그래피를 이용하여 에틸아세테이트 및 메탄올의 혼합용액으로 용출된 분획물을 포함한다. 더욱 바람직하게는 상기 조성물은 실리카겔 90:10(에틸아세테이트:메탄올) 분획물을 포함한다.

[0024] 본 발명의 조성물에서, 바람직하게는 조성물 총중량에 대하여 상기 차전초의 추출물은 0.0001 내지 90 중량%로 포함할 수 있다.

- [0025] 본 발명의 다른 일측면에 따르면, 본 발명은 차전초 추출물을 유효성분으로 함유하는 상기 조성물을 포함하는 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 앞에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 차전초 및 이를 포함하는 차전초 추출물(또는 분획물)은 Fe-NTA 등에 의한 산화적 스트레스에 의한 심각한 간 손상을 억제하여, 본 발명의 조성물은 Fe-NTA 등에 의한 산화적 스트레스에 의한 간 기능 저하, 간 손상 내지 간 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약제학적 조성물은 당업계에 알려진 통상의 방법에 의해 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 주사제, 크림, 젤, 패취, 분무제 또는 연고제 등의 형태로 제제화될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은, 약제학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0029] 통상적으로 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 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), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 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, 동결건조제, 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 위템솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 기준으로 0.001 내지 4000 mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해 1 내지 2000 mg/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.
- [0031] 본 발명에서 상기 플란타마조사이드를 실험용 랫트를 대상으로 한 급성독성검사 결과, 경구투여 시 최소치사량(LD50)은 적어도 2g/kg 이상으로 전혀 독성효과를 나타내지 않음으로써 생체 안전성이 매우 높다는 것을 알 수 있다.
- [0032] 본 발명의 추출물은 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.
- [0033] 본 발명의 또 다른 일 측면에 따르면, 본 발명은 차전초 추출물을 유효성분으로 함유하는 상기 조성물을 포함하는 간 기능 장애 예방 또는 개선용 건강기능성 식품조성물을 제공한다.
- [0034] 앞에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 차전초 및 이를 포함하는 차전초 추출물(또는 분획물)은 Fe-NTA 등에 의한 산화적 스트레스에 의한 심각한 간 손상을 억제하여, 본 발명의 조성물은 Fe-NTA 등에 의한 산화적 스트레스에 의한 간 기능 저하 내지 간 손상과 같은 간 질환의 예방 및 개선에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0035] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함한다. 본 명세서에서 건강기능성 식품이란, 건강기능식품에 관한 법률 제672호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은

보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

- [0036] 본 발명의 식품 조성물에서, 유효성분의 혼합량은 사용목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니며 상기 추출물은 조성물 총중량에 대하여 0.0001 내지 90 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명의 식품은, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 더 포함할 수도 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료 형태로 제제화될 수 있다.
- [0037] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능성 식품은 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 적당한 방법으로 과립상으로 한 다음 활택제 등을 넣어 압축성형하여 조제하거나 정제 형태의 건강기능식품을 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 직접 압축성형하여 만들거나 또는 미리 만든 과립에 건강기능식품을 그대로 혹은 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 다음 압축성형하여 조제하거나 건강기능식품에 부형제, 결합제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 분말을 용매로 습윤시키고, 습윤된 분말을 저압으로 틀에 넣어서 성형한 후, 적당한 방법으로 건조하여 조제한다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품에 필요에 따라 교미제 등을 넣을 수 있으며, 적당한 제피제로 제피 가능하다.
- [0038] 상기 캡셀 형태의 건강기능성 식품 중 경질캡셀제는 보통 캡셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 고르게 섞은 것 또는 적당한 방법으로 입상으로 한 것 또는 입상으로 한 것에 적당한 제피제로 제피한 것을 그대로 또는 가볍게 성형하여 충전하여 조제하며, 연질캡셀제는 보통 캡셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 넣은 것을 젤라틴 등 적당한 캡셀기체에 글리세린 또는 소르비톨 등을 넣어 소성을 높인 캡셀기체로 피포하여 일정한 형상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 상기 캡셀기체에 착색료 보존료 등을 첨가할 수 있다.
- [0039] 상기 환형태의 건강기능성 식품은 보통 건강기능식품에 부형제, 결합제, 붕해제 등을 고르게 섞은 다음 적당한 방법으로 구상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 조성물은, 관련 질환의 예방을 위한 건강보조식품의 식품보조첨가제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0041] 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은, 일반적으로 본 발명의 식품 조성물의 경우 전체식품 중량의 0.0001 내지 50 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100ml를 기준으로 0.0001 내지 20 중량%로 가할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 정의되는 추출물 이외의 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함한다.
- [0043] 상기 음료 조성물의 경우, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물 이외 함유하는 액체 성분에는 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 예를 들어, 포도당, 과당 등의 모노사카라이드 예를 들어, 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드 예를 들어, 텍스트린, 사이클로 텍스트린 등의 폴리사카라이드 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0044] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 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 조성물 100 중량부 당 0.001 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0045] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 의한 차전초 추출물은 간 독성 물질인 Fe-NTA 등 산화스트레스에 의한 간 기능 장애 치료 효과가 있으므로 간 기능 장애 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 의한 차전초 추출물은 천연물 추출물로서 부작용 및 독성 발현율이 매우 낮고 생체 친화적으로 간 기능 장애를 예방 또는 치료할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

[0046] 나아가, 본 발명은 차전초 추출물의 활용범위를 단순한 식품에서 예방용 혹은 치료용 약물로까지 확대시킴으로써 차전초의 가치를 높이고 관련 업종 종사자의 수입증대로 까지 이어질 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 Fe-NTA에 의한 랫트 간조직의 지질과산화물 말론디알데하이드(MDA) 증가에 대한 차전초 추출물(PAE) 전처리 효과를 나타낸 것이다. 값은 평균(n=3)±SD를 나타내고, 유의차는 P<0.01임.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] 시험 재료 및 방법

[0050] 시험물질

[0051] 다 자란 차전초 잎은 충청북도 제천시(주) 약초장터를 통하여 구매하였으며, 1차 동결건조된 차전초 잎을 분쇄하여 주정에탄올에서 3시간 동안 3번 반복 환류 냉각 추출 후, 주정에탄올 추출물은 원심분리(7000 rpm, 15 min, 4℃) 한 후 재차 상등액을 whatman No. 42로 여과하였다.

[0052] 여과된 상등액을 추출용매를 완전히 제거하기 위해 감압증류한 다음 동결건조를 하여 주정에탄올 추출물 분말을 얻었다. 차전초 잎의 주정에탄올 추출물은 차광 상태로 -70℃ 냉동 보관하여 사용하였으며, 각 투여군의 농도에 따라 멸균 정제수에 현탁하여 사용하였다.

[0053] 시험 동물 및 사육환경

[0054] 본 발명에서는 (주) 샘타코로부터 구입한 7~8 주령의 Wistar rat을 사용하였다. 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것 중 체중이 260 ± 5 g의 것을 시험에 사용하였다. 실험동물은 온도 23 ± 3℃, 상대습도 50 ± 10%, 환기회수 10~20 회/hr, 조명 시간 12시간(08:00 점등~20:00 소등), 조도 150~300 Lux로 설정된 환경에서 랫트 사육상자(225 W x 200 L x 180 H mm)당 1마리를 사육하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0055] Fe-NTA(Ferric nitrilotriacetate) 용액의 준비

[0056] Fe-NTA 용액은 Khan과 Sultana(*Chemico-Biological Interactions*, **149**, 23-35, 2004) 방법을 이용, 신선하게 준비하여 시험에 즉시 사용하였다. Ferric nitrate (0.24 mmol/kg body weight(b.w.)) 용액은 4배 농도가 높은 NTA (0.96 mmol/kg b.w.) 용액과 혼합 후 탄산수소나트륨(sodium bicarbonate)으로 pH를 7.4로 보정하여 사용하였다.

[0057] 실험그룹과 투여물질

[0058] 실험 그룹은 아무것도 처리하지 않은 대조군 그룹, 오직 산화스트레스만 유발한 음성대조군인 Fe-NTA 그룹, 차전초 추출물을 농도별(1, 2, 4 g/kg b.w.)로 투여 후 Fe-NTA를 처리한 3그룹으로 나누고, 총 5그룹으로 나누고 각 그룹의 랫트 배정은 무작위적으로 배정하였다. 차전초 주정에탄올 추출물은 임상적용경로를 따라 경구로 투

여하였으며, 1일 1회 7일간 일정시간에 차전초 추출물 1, 2, 4 g/kg b.w.을 경구투여한 후, 마지막 7일째 되는 날 Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg b.w.)를 복강 주사하여 급성 간 독성을 유발하였다. 대조군은 Fe-NTA 대신 생리식염수를 복강 주사하였다. 복강 주사한지 18시간 후, CO₂로 마취시켜 혈액학적 분석을 위하여 복대 정맥으로부터 채혈하였다. 간 조직은 생화학적 분석을 위해서 액체 질소로 급속 냉동 후 -70℃에 저장하였다. 채취한 혈액은 3000 rpm, 4℃에서 15분간 원심 분리하여 혈청과 분리하고 장기와 혈액시료는 분석 전까지 -70℃에 보관하였다.

[0059] **통계처리**

[0060] 모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며 SigmaStat(Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA)을 사용하여 t-test와 one-way ANOVA로 유의차 검정을 실시하여 $p < 0.05$ 이상의 경우에만 그룹 간 유의차가 있는 것으로 인정하였다.

[0061] **실시예 1. 차전초 추출물의 혈청생화학적 영향 평가**

[0062] 혈액 샘플을 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 혈장만을 모아 혈액학적 수치를 측정하였다. 혈액학적 수치는 Bayer (USA)사의 ALT (alanin aminotransferase) reagent kit와 AST (aspartate aminotransferase) reagent kit를 ADVIA (Japan) 분석기를 사용하여 측정하였다.

[0063] 혈청 중 ALT (alanin aminotransferase)와 AST (aspartate aminotransferase)는 간세포 내에 있는 효소로 간 독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행함에 따라 aminotransferase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 간 손상의 지표로 사용되었다.

[0064] 혈청 중 ALT와 AST는 간세포 내에 있는 효소로 GPT (glutamic pyruvic transaminase)와 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)라고도 한다. 이 효소들은 거의 모든 장기에 존재하며, 이 중 AST는 심장, 간, 골격, 혈구 내에 주로 존재하고, 80%가 세포 내의 미토콘드리아에 존재한다. 이에 비해 ALT는 주로 간에 분포하고 세포질에 존재한다. 표 1에서 보는 바와 같이 ALT 및 AST는 Fe-NTA 투여 이후 혈청생화학 수치가 대조군의 37.13 U/L, 132.25 U/L에 비해 각각 242.88 U/L와 901.13 U/L로 약 6.5배 및 6.8배의 증가를 나타냈다. 이는 Fe-NTA에 의해 간이 손상을 입은 결과를 나타내며, 반면에 차전초 추출물을 1 g/kg b.w. 투여한 군에서는 ALT 및 AST의 활성이 각각 95.25 U/L와 371.38 U/L으로, 2 g/kg b.w. 군에서는 각각 99.88 U/L와 393.25 U/L으로, 4 g/kg b.w. 군에서는 각각 64.57 U/L와 228.63 U/L으로 Fe-NTA에 의해 유발된 산화스트레스 손상을 월등히 감소시키는 효과를 보여 (* $P < 0.05$) Fe-NTA에 유발되는 iron-induced oxidative stress에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 있음을 보여 주었다. 또한, 차전초 추출물의 농도 의존적으로 높은 농도로 투여 한 4 g/kg b.w. 투여군에서 1 또는 2 g/kg b.w. 투여군보다 Fe-NTA에 의한 간 독성에 대한 보호 효과가 더 높음을 확인함으로써 차전초 추출물이 간 보호 효과가 있음을 알 수 있다.

표 1

Table 1. Effects of pre-treatment with *Plantago asiatica* extract (PAE) on Fe-NTA-mediated accretion of liver serum enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) level in rat

Treatment groups	ALT (mg/dL)	AST (mg/dL)
Saline (control)	37.13 ± 5.67***	132.25 ± 12.04***
Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	242.88 ± 146.75	901.13 ± 393.01
PAE (1 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	95.25 ± 30.33*	371.38 ± 115.75**
PAE (2 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	99.88 ± 25.14*	393.25 ± 74.06**
PAE (4 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	64.57 ± 19.19**	228.63 ± 103.24***

Value are expressed as mean ± SD (n=5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$ compared with rat treated with Fe-NTA alone.

[0065]

[0066]

실시예 2. 차전초 추출물의 GSH(Reduced glutathion)에 대한 영향 평가

[0067]

TBARs와 같은 조직분쇄 상등액에 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)를 더한 후 100 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)를 잘 혼합하고 5분후에 분광광도계를 이용하여 412 nm에서 측정하였다. 이때 상등액 대신 GSH 표준품을 농도별로 측정하여 얻어낸 검량곡선을 이용하여 샘플의 GSH 함량을 측정하였다.

[0068]

GSH는 글루타치온 설파하이드릴(glutathione sulphydryl)의 일반적인 명칭이며 글리신(glycine), 글루타민(glutamine), 시스테인(cystein) 세 가지 아미노산이 결합되어 만든 형태의 트리펩타이드(tripeptide)로 체내에서 자연적으로 생성된다(Akerboom, T.P. and Sies, H., *Methods enzymolo.*, **77**, 373-382, 1981). GSH는 온몸의 세포에서 만들어지며 외부로부터 들어온 독성 물질이나 몸 안에서 생성되는 산화물질인 라디칼들을 인체 내에서 안정화 시키거나 체외로 배출 시키는 작용을 하는 매우 중요한 항산화 물질중 하나이다. 이 작용은 GSH가 관여하는 효소시스템에 의해서 일어난다(Dolphin, D. *et al.*, (eds.), in *glutathione: Chemicals, Biochemical and Metabolic Aspects*, Vols. A and B, *J. Wiley and Sons*).

[0069]

표 2에 나타난 바와 같이, Fe-NTA만 처리한 그룹(92.95 mmol GSH/g tissue)은 대조군 그룹(193.11 mmol GSH/g tissue)에 비해 GSH(reduced glutathione)가 현저히 줄어들어 있으며, 이는 iron-induced oxidative stress에 의해 항산화지표인 GSH가 많이 소실되어 있는 결과를 보이고 있다. 하지만 차전초 추출물을 처리한 그룹에서는 농도 의존적으로 증가하고 1 g/kg b.w. 이상의 농도 투여군 부터는 유의적 차이(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)를 보이며 GSH 생성을 회복시키는 것을 나타내고 있다. 표 2에서 보는 바와 같이 차전초 추출물 1, 2, 4 g/kg 투여한 그룹은 119.87, 135.28, 180.29 mmol GSH/g tissue로 Fe-NTA 그룹에 비해 약 1.3배, 1.5배, 1.9배 증가한 것으로 나타나 GSH 생성을 월등히 증가시켜 Fe-NTA의 산화스트레스로 유발되는 GSH 감소에 의한 간 손상에 대한 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 차전초 추출물이 생체 내에서 항산화물질로 작용하는 GSH 함량을 증가시켜 산화스트레스에 대한 방어 효과를 나타내는 것으로 추정할 수 있다. Lone 등(*Food and Chemical Toxicology*, **45**, 1821 - 1829, 2007)도 식물유래 물질을 투여 후 Fe-NTA로 산화스트레스 유발 후 간에서 GSH 함량을 측정하였을 때 본 발명과 같은 증가를 나타내 간 보호효과를 증명한 바 있다. 또한, 본 발명에서는 차전초 추출물 4 g/kg b.w. 투여 그룹은 아무것도 처리하지 않은 정상상태의 대조군 그룹과 유의적 차이를 나타내지 않으며 비슷한 GSH 함량을 나타내 항산화 효과를 바탕으로 한 간 보호 효과가 월등히 높음을 확인할 수 있었다.

[0070]

실시예 3. 차전초 추출물의 GST(Glutathione-S-transferase) 영향 평가

[0071]

GST 시험액은 GSH 시험액에 사용한 동일한 상등액에 0.1 M PB (pH 6.5)와 1M GSH, 1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)를 혼합 후 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 5분 동안 측정하였다.

[0072] GST는 사이토졸, 미토콘드리아, 마이크로솜 등의 세포기관 내에 존재하는 단백질 효소로 진행과 원핵생물 모두에 있으며 발암성 또는 독성물질, 산화스트레스 유발물질, 약물 등 다양한 범주에서 이들을 안전한 형태로 변환 또는 억제하는 효소중의 하나로 이들을 해독 또는 제거하는데 중요한 역할을 하는 효소이다. 특히 GST는 -SH를 이용한 GSH 결합을 촉매하는 효소로 생체 내에서 유용한 작용을 한다.

[0073] Lone 등(*Food and Chemical Toxicology*, **45**, 1821 - 1829, 2007)은 Fe-NTA에 의한 산화스트레스에 의해 GST가 감소하는 것을 보였으며, 이에 이소플라본(isoflavone)을 투여하였을 시 다시 회복이 되는 결과를 보였다. 본 발명에서도 랫트의 간에서 Fe-NTA에 의해 GST가 대조군(65.44 Units/g tissue)에 비해 28% 감소(46.98 Units/g tissue)한 결과를 보였다. 그러나 여기에 차전초 추출물을 1, 2, 4 g/kg 투여한 그룹에서는 각각 54.87, 56.02, 60.48 Units/g tissue로 Fe-NTA 그룹과 유의적 차이(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$)를 보이며 증가한 양상을 보였다. 차전초 추출물은 우리 몸에서 항산화 작용과 외부로부터 유입된 독성물질을 제거하는데 관여하는 phase II 효소인 GST를 증진시켜 Fe-NTA에 의해 유발되는 산화스트레스를 억제하여 주는 결과를 보였다(표 2). 이는 GSH 측정실험의 결과와 같은 경향으로 차전초 추출물은 생체에서 생성되는 항산화 물질을 증진시키거나 항산화 작용과 직접적으로 연결되는 효소를 활성화시켜 산화스트레스에 대한 보호효과를 보인다. 특히 Fe-NTA로 유발된 산화스트레스에 의해 간의 기능이 저하되지만 차전초 추출물이 GST를 증진시켜 간 기능을 회복시키는 물론 4 g/kg의 투여군은 정상 상태로 회복을 시켰다.

표 2

Table 2. Effects of pre-treatment with *Plantago asiatica* extract (PAE) on Fe-NTA-mediated depletion of liver glutathione content and decrease in the activities of glutathione metabolizing enzymes, glutathione-S-transferase, glutathione reductase and superoxide dismutase level in rat

Treatment groups	Reduced glutathione (mmol GSH/g tissue)	Glutathione-S-transferase (Units/g tissue)	Glutathione reductase (Units/g tissue)	Superoxide dismutase (Units/g tissue)
Saline (control)	193.11 ± 14.94***	65.44 ± 3.92***	39.51 ± 5.75*	1041.26 ± 102.31*
Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	92.95 ± 13.48	46.98 ± 3.31	26.51 ± 2.27	650.43 ± 70.46
PAE (1 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	119.87 ± 6.92*	54.87 ± 2.31*	30.63 ± 2.66	788.19 ± 165.90
PAE (2 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	135.28 ± 9.30*	56.02 ± 2.15**	35.75 ± 3.55*	916.07 ± 144.87*
PAE (4 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	180.29 ± 18.21**	60.48 ± 6.27***	40.82 ± 8.17*	999.31 ± 114.21*

Value are expressed as mean ± SD (n=3), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with rat treated with Fe-NTA alone.

[0074]

[0075] 실시예 4. 차전초 추출물의 GR(Glutathione reductase) 영향 평가

[0076] GR 시험액은 GSH에 사용한 상등액에 0.1 M PB (pH 7.4)에 5 mM EDTA, 10 mM oxidized GSH (GSSG), 1mM β -NADPH, 1% BSA를 혼합 후 5분 동안 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 측정하였다.

[0077] GR은 생체 내 여러 조직에 분포하고 있으며 GSSG(oxidized glutathione)을 GSH로 환원시키는 작용을 촉매하는 효소이다. GSH는 퍼옥사이드(peroxide)를 제거하는 작용을 하는 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase)와 조직으로부터 외인성 물질의 결합과 제거 작용을 하는 GST의 기질로 쓰인다(Dolphin, D. *et al.*, (eds.), in glutathione: Chemicals, Biochemical and Metabolic Aspects, Vols. A and B, *J. Wiley and Sons*). 이처럼 GR은 우리 몸에서 중요한 항산화 물질로 작용하는 GSH의 생산에 관여하며, 직접적으로 유리라디칼 또는 조직내 퍼옥사이드(peroxide)와 반응하여 제거하는 생체 내에서 중요한 항산화 효소이다.

[0078] 표 2에 나타난 바와 같이, Fe-NTA에 의해 간에 산화스트레스가 유발된 그룹은 26.51 Units/g tissue로 아무것도 처리하지 않은 대조군(39.51 Units/g tissue)에 비해 GR 수치가 33%가 감소하여 Fe-NTA에 의한 간에서의 산화적 손상이 관찰되었다. 그러나 표 2에서 보는 바와 같이 차전초 추출물의 농도를 달리하여(1, 2, 4 g/kg) 투여한 각각의 그룹에서는 30.63, 35.75, 40.82 Units/g tissue로 GR의 수준이 농도 의존적으로 회복이 되어 Fe-NTA에 의한 산화적 손상이 차전초 추출물의 투여에 의해 억제 되는 것을 확인 하였다. 더구나 4 g/kg의 차전초 추출물

투여군에서는 대조군과 유의적 차이를 보이지 않으며 비슷한 수준을 보이는 것을 보아 높은 농도로 차전초 추출물을 투여할수록 산화적 손상을 대부분 막아주는 것으로 보인다.

[0079] Fe-NTA에 의한 간의 산화적 손상으로부터 차전초 추출물이 GR의 수준을 회복시킴으로서 간기능 보호 효과를 보임과 동시에 회복된 GR의 수준은 이에 영향을 받는 GSH의 수준을 회복시키고, 회복된 GSH는 역시 GST의 수준을 회복시키는 것을 관찰하였다. 이러한 결과들을 통해서 차전초 추출물이 생체 내에서 산화적 스트레스에 의한 손상을 억제하는 기작은 항산화 바이오 마커들(GSH, GST, GR 등)을 대조군 수준으로 회복시킴으로써 나타난다는 것을 알 수 있었다. 위 결과를 통해 차전초 추출물 처리군이 Fe-NTA군에 비해 간에서 산화적 스트레스를 억제해주었음을 보여주었고, 간의 직접적인 작용에 의해 나타나는 ALT와 AST의 수치가 대조군 수준으로 회복된 결과에 의해 간 기능이 회복되었다는 것을 검증하여 차전초 추출물이 간 기능 보호 효과를 나타낸다는 것을 밝혔다.

[0080] 실시예 5. SOD(Superoxide dismutase) 평가

[0081] SOD 시험액은 GSH에 사용한 것과 같은 상등액에 2 mM xanthine, 1 mM EDTA, 0.04 g/ml BSA, 500 uM nitro blue tetrazolium (NBT), 0.25 unit/ml xanthine oxidase를 잘 혼합하고 20 min 후에 분광 광도계를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

[0082] SOD는 과산화물음이온(superoxide anion, $2O_2^-$)을 산소와 과산화수소로 분해하는 산화환원효소이다. 이 효소는 미토콘드리아에 많이 분포하고 있으며 산화스트레스를 감소시키는 역할을 하고 있다. SOD에 의해 생성된 과산화수소는 카탈라제(catalase)와 퍼옥시다제(oxidase) 등에 의해 인체에 무해한 산소와 물로 완전히 분해된다. 이처럼 SOD는 우리 몸에서 산화스트레스에 대해 방어기작으로 중요한 항산화 작용을 하며, 직접적으로 유리 라디칼 또는 조직 내 과산화수소(hydrogen peroxide)에 작용하여 제거하는 생체 내에서 중요한 항산화 효소이다.

[0083] 표 2에 나타난 바와 같이, Fe-NTA만 처리한 그룹(650.43 Units/g tissue)은 대조군 그룹(1041.26 Units/g tissue)에 비해 SOD가 현저히 줄어들어 있으며, 이는 iron-induced oxidative stress에 의해 항산화지표인 SOD가 많이 소실되어 있는 결과를 보이고 있다. 하지만 차전초 추출물을 처리한 그룹에서는 농도 의존적으로 증가하고 2 g/kg b.w. 이상의 농도 투여군 부터는 유의적 차이($P < 0.05$)를 보이며 SOD 생성을 회복시키는 것을 나타내고 있다. 표 2에서 보는 바와 같이 차전초 추출물 1, 2, 4 g/kg 투여한 그룹은 788.19, 916.07, 999.31 Units/g tissue으로 Fe-NTA 그룹에 비해 약 1.2배, 1.4배, 1.5배 증가한 것으로 나타나 SOD 생성을 월등히 증가시켜 Fe-NTA의 산화스트레스로 유발되는 SOD 감소에 의한 간 손상에 대한 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 차전초 추출물이 생체 내에서 항산화 작용을 하는 효소인 SOD 함량을 증가시켜 산화스트레스에 대한 방어 효과를 나타내는 것으로 추정할 수 있다. Lone 등(*Food and Chemical Toxicology*, **45**, 1821 - 1829, 2007)도 식물유래 물질을 투여 후 Fe-NTA로 산화스트레스 유발 후 간에서 SOD 함량을 측정하였을 때, 본 발명과 같은 증가를 나타내 간 보호효과를 증명한 바 있다. 또한 본 발명에서는 차전초 추출물 4 g/kg b.w. 투여 그룹은 아무것도 처리하지 않은 정상상태의 대조군 그룹과 유의적 차이를 나타내지 않으며 비슷한 SOD 함량을 나타내 항산화 효과를 바탕으로 한 간 보호 효과가 월등히 높음을 확인할 수 있었다.

[0084] 실시예 6. 차전초 추출물의 지질과산화물 (Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) 영향 평가

[0085] 균질기를 이용하여 간 조직을 0.1M phosphate buffer (pH 7.4, 1.17% KCl)에서 잘 마쇄한 다음, 그 상등액에 trichloroacetic acid (TCA) buffer (0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 95℃ 수조에서 30분 동안 끓인 후 상온으로 식힌다. 원심분리(1000 rpm, 10 min) 후 상층액을 분광광도계를 이용하여 535 nm에서 측정하였다. TBARS는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA) equivalent의 표준 곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도($\mu\text{mol/g protein}$)로 표기하였다.

[0086] 본 실시예는 조직 손상 정도와 관련된 것으로 조직 내 ROS가 발생하면 인지질 막에 다량 함유되어 있는 불포화 지방산 수소원자를 제거하게 된다. 이로써 지질과산화(lipid peroxidation)의 연쇄반응이 유발되고, 지방산 사슬에서 퍼옥실 라디칼(peroxyl radical)과 알콕실 라디칼(alkoxyl radical)이 생성된다. 이것들은 수소원자와 결합하여 과산화지질(lipid hydroperoxide)을 생성하는데 이는 분해되어 최종적으로 MDA 등의 알데하이드(aldehyde)를 생성한다. 이렇게 생성된 지질과산화물은 세포막의 투과성을 증가시키고 체액의 손실 및 단백질 변화를 유발한다. 이는 암이나 동맥경화, 고혈압 등의 각종 질병을 일으킬 수 있다. 본 실시예에서 TBARS 법에

의해 지질과산화의 생성지표인 MDA를 측정하였으며, TBARs 법에서는 thiobarbituric acid와 불포화지방산이 반응하여 malondialdehyde를 생성하며 이것은 붉은 빛을 띠게 한다. 이 붉은 빛을 띠는 물질을 분광광도계에서 535 nm에서 측정하였다.

- [0087] Fe-NTA는 iron-induced oxidative stress로 인해 간독성에 관여되어 있다고 보고되어 있는 물질로 시험 결과 Fe-NTA 만 처리한, 즉 산화스트레스만 유발한 그룹은 206.74 $\mu\text{mol/g tissue}$ 으로 대조군 그룹의 92.10 $\mu\text{mol/g tissue}$ 보다 지질과산화를 많이 일으켜 2.2배 많은 MDA를 생성하였지만, 차전초 추출물을 투여한 그룹에서는 농도 의존적으로 MDA의 생성이 감소하는 경향을 보이며 2 g/kg b.w. 이상의 농도 투여군 부터는 Fe-NTA군과 유의적 차이($*P<0.05$)를 보이며 MDA 생성을 감소시킨 것을 나타내고 있다. 도 1에서 보는 바와 같이 차전초 추출물을 1, 2, 4 g/kg 투여한 그룹은 MDA의 생성량이 154.46, 133.22, 109.53 $\mu\text{mol/g tissue}$ 로 Fe-NTA군에 비해 약 25%, 36%, 47% 감소한 것으로 나타나 MDA 생성을 월등히 줄여줌으로써 Fe-NTA의 산화스트레스로 유발되는 지질과산화물에 대한 간 보호 효과가 있음을 확인할 수 있다. 특히 고농도인 4 g/kg b.w. 투여 그룹은 정상상태의 대조군 그룹과 거의 유사한 MDA 생성 상태를 보여 항산화 효과를 바탕으로 한 간 보호 효과가 월등히 높음을 확인할 수 있었다.
- [0088] 본 실시예를 통해 간에서 Fe-NTA에 의한 산화스트레스로 지질과산화물의 생성이 급격히 증가하지만 차전초 추출물 투여로 지질과산화물의 생성을 유의적으로 줄여줌으로써, 지질과산화물 생성 억제에 의한 간 보호효과를 증명하였으며, 이는 앞선 항산화물질이나 항산화 효소 등의 바이오 마커들과 연관되어 차전초 추출물의 항산화 효과를 바탕으로 한 간 보호 효과가 있음을 확인 할 수 있다.

[0089] **제제예 1 : 정제의 제조**

- [0090] 플란타마조사이드 100mg, 옥수수전분 90.0mg, 유당 175.0mg, 엘-히드록시프로필셀룰로오스 15.0mg, 폴리비닐피롤리돈 905.0mg 및 에탄올 적량의 원료를 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 1.8mg을 가하여 혼합한 후 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.

[0091] **제제예 2. 건강기능성 식품의 제조**

- | | | |
|--------|-------------|-------------------|
| [0092] | 차전초 추출물 | 500 mg |
| [0093] | 비타민 혼합물 | 적량 |
| [0094] | 비타민 A 아세테이트 | 70 μg |
| [0095] | 비타민 E | 1.0 mg |
| [0096] | 비타민 B1 | 0.13 mg |
| [0097] | 비타민 B2 | 0.15 mg |
| [0098] | 비타민 B6 | 0.5 mg |
| [0099] | 비타민 B12 | 0.2 μg |
| [0100] | 비타민 C | 10 mg |
| [0101] | 비오틴 | 10 μg |
| [0102] | 니코틴산아미드 | 1.7 mg |
| [0103] | 엽산 | 50 μg |
| [0104] | 판토텐산 칼슘 | 0.5 mg |
| [0105] | 무기질 혼합물 | 적량 |
| [0106] | 황산제1철 | 1.75 mg |
| [0107] | 산화아연 | 0.82 mg |
| [0108] | 탄산마그네슘 | 25.3 mg |

[0109]	제1인산칼륨	15 mg
[0110]	제2인산칼슘	55 mg
[0111]	구연산칼륨	90 mg
[0112]	탄산칼슘	100 mg
[0113]	염화마그네슘	24.8 mg

[0114] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능성 식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능성 식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능성 식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0115] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

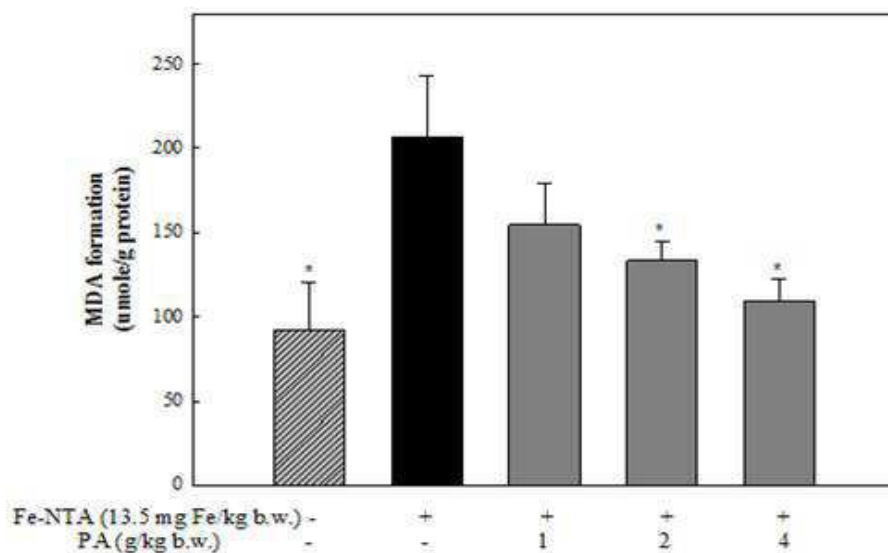


Fig. 1. Effects of pre-treatment with *Plantago asiatica* extract (PAE) on Fe-NTA-mediated accretion of liver malondialdehyde in rat.

Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). Significant difference is $P < 0.01$.