(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0102558
(43) 공개일자 2011년09월19일

(51) Int. Cl.
A61K 36/15 (2006.01) *A61P 9/12* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0021617
(22) 출원일자 2010년03월11일
심사청구일자 2010년03월11일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
정현숙
광주광역시 북구 일곡동 롯데아파트 107동 404호
박재영
광주광역시 남구 월산5동 광남연립주택 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

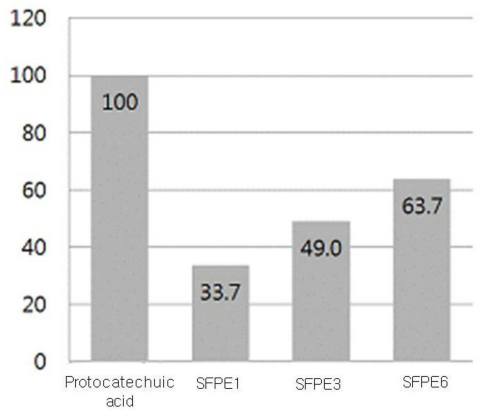
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발효에 의해 프로토카테큐산이 증가된 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강식품 조성물

(57) 요 약

본 발명은 솔잎 추출액을 발효시켜 프로토카테큐산(protocatechuic acid)이 증가되는 것을 특징으로 하는 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강식품 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도10



(72) 발명자

황인덕
광주광역시 서구 치평동 우미아파트 101동 311호

정주영
광주광역시 남구 진월동 리채아파트 301동 301호

이창수
광주광역시 남구 진월동 현대2차 202동 1708호

김희성
전라남도 나주시 토계동 551번지

임동윤
광주광역시 서구 화정동 769-1

오원근
광주광역시 북구 두암동 부영아파트 106동 809호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M-02-20080703194142
부처명 한국산업기술진흥원
연구관리전문기관
연구사업명 지역혁신인력양성사업
연구과제명 솔잎발효액의 항고혈압 작용기전 및 산업화
기여율
주관기관 조선대학교산학협력단
연구기간 2009년 05월 01일 ~ 2010년 04월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

솔잎 추출액을 발효시켜 프로토카테큐산(protocatechuic acid)이 증가되는 것을 특징으로 하는 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로토카테큐산은 솔잎 발효액의 에틸아세테이트 층에서 분리된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 혈전, 고혈압, 고지혈증, 뇌경색, 노인성 치매, 동맥경화증, 부정맥, 협심증, 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 심근경색으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 솔잎 발효액은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물:

(a) 솔잎을 물에 담근 후 2~5회 세척하고, 다시 숯을 우려낸 물로 1~2회 세척하는 단계;

(b) 상기 솔잎을 탈수시키고, 착즙한 액을 2~4시간 동안 저온 분리하여 상징액을 수득하는 단계; 및

(c) 상기 상징액을 25-30℃의 진탕 배양기에서 240~300 rpm으로 4~8개월 동안 배양하여 발효시키는 단계.

청구항 5

솔잎 추출액을 발효시켜 프로토카테큐산(protocatechuic acid)이 증가되는 것을 특징으로 하는 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 프로토카테큐산은 솔잎 발효액의 에틸아세테이트 층에서 분리된 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 혈전, 고혈압, 고지혈증, 뇌경색, 노인성 치매, 동맥경화증, 부정맥, 협심증, 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 심근경색으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 솔잎 추출액을 발효시켜 프로토카테큐산(protocatechuic acid)이 증가되는 것을 특징으로 하는 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사회가 서구화되고, 고지방, 고열량 음식을 섭취함에 따라 그로 인하여 현대인의 문명병이 발생하고 있다. 또한, 의료기술의 발달과 높아진 생활문화로 인하여 삶의 질은 높아지고, 웰빙이라는 신조어가 생기면서 건강에 대한 높은 관심을 가지게 되었다. 더욱이 노인 인구가 증가하고, 그에 따라 건강에 중요한 혈액 순환제가 각광받게 되었다. 현재 세계 모든 나라에서 혈전 및 혈소판 응집이 원인인 고혈압, 심장병, 뇌졸중 등 순환기 질환

에 의한 사망률이 증가하고 있어, 안전하면서 유효한 항혈전제를 개발하려는 노력이 증대되었다.

[0003] 혈전은 혈액 인자의 응집물로서, 주로 혈소판 및 피브린의 응집물로 이루어지며, 통상적으로 혈관의 과도한 출혈을 막기 위하여 형성된다. 혈소판이 내피하층의 표면과 접촉시 혈전을 생성시켜 혈관계를 차단하는 반응이 개시되는데 이러한 과정을 지혈이라고 하고, 상기 과정은 상처 부위에서 과도한 출혈을 막는데 매우 중요하다. 동맥 혈전은 국소 폐색에 의한 심각한 질환을 야기하는 반면, 정맥 혈전은 주로 원거리 폐색, 또는 색전을 야기한다.

[0004] 혈관을 막는 기전은 혈액응고 기전과 혈전형성 기전이 존재한다. 혈액응고 기전은 용해성 피브리노젠이 난용성 피브린으로 변화되어 혈액이 응고되는 것으로, 주개시자로는 외인성 인자인 조직인자(TF; tissue factor)와 외인성 인자인 VIIa 인자(factor VIIa)가 있다. 각 단계에서 여러 가지 응고 인자를 활성화시켜 섬유소 응고(fibrin clot; cross-linked fibrin molecule)가 형성되고, 이때 트롬빈이 생성되는데 이 물질이 강한 혈소판 활성물질로 활성화 인자 방출을 자극하게 된다. 혈전형성 기전은 손상된 혈관 내피 노출시 혈소판이 콜라겐에 부착되고, 서로 활성화에 의해 점성의 젤라틴 덩어리를 형성하는 것이므로, 정상적인 혈관 내피 세포에 생기는 것이 아니라 손상된 혈관으로부터의 출혈을 막기 위한 자발적인 과정이다.

[0005] 현재까지 혈전증의 치료에 전형적으로 사용되어온 의약품은 유로키나아제(urokinase), 스트렙토키나아제(streptokinase) 및 tPA(tissue-type plasminogen activator) 등이 있다. 그러나, 이들은 고가이며, 반감기가 짧고 전신출혈의 부작용이 있으며, 유로키나아제를 제외하고는 경구투여가 불가능하다는 단점 등의 문제점을 지니고 있다. 따라서, 이러한 혈전증 치료제의 제한성 때문에 현재 혈전증을 치료하기 위한 새로운 방법들이 모색되고 있다.

[0006] 소나무(pinus densiflora Siebold et Zuccarini)는 소나무과(pinaceae)에 속하는 사록 침엽성 교목으로 우리나라 전국의 산에 야생하고 있다. 솔잎은 예로부터 건위, 보혈작용이 있고 중풍, 동맥경화, 고혈압, 당뇨병 등을 예방하는 효능이 있는 것으로 알려져 왔으며 선식이나 차로도 이용되고 있다.

[0007] 솔잎의 활성 성분이며 휘발성 항생물질인 테르펜은 솔잎에 약 7-12% 가량 들어 있고 다량의 이소프렌으로 구성되어 모노테르펜(monoterpene), 세스퀴테르펜(sesquiterpene), 디테르펜(diterpene)이라고 불리며, 항생, 항암, 혈압강하, 호르몬 분비촉진, 항산화 등과 같은 독특한 약리작용 효과가 있어 아로마테라피(aroma theraphy)에 사용되기도 한다. 동의보감과 본초강목에서도 솔잎은 뇌졸증과 고혈압 등에 좋은 장수약으로 전하고 있다. 솔잎이 이런 칭송을 받게 된 데에는 그럴만한 이유가 있다. 테르펜의 자극과 신체활성에 의한 혈액순환과 혈관벽 강화작용도 하나의 이유가 되겠지만, 솔잎에 들어 있는 독특한 지방산도 큰 기여를 한다. 솔잎에는 리놀렌산이 약 20%로서 가장 많이 들어 있고, 그 다음이 팔미트산으로 10%를 차지한다. 이외에도 쉽게 산화되지 않는 5-올레핀산을 비롯한 고도불포화지방산이 많이 들어 있다. 산화가 되지 않으므로 과산화지질 같은 유해물질을 만들지도 않고 노화도 방지되는 것이다.

[0008] 한국특허공개 제2008-0066115호에는 혈전용해 증강 기능성 발효물 및 그 발효방법에 대해서 개시하고 있으며, 한국특허공개 제2003-0048487호에는 숙취해소 효과가 있는 솔잎의 다단발효추출물이 개시되어 있으나, 본 발명의 발효에 의해 프로토카테큐산이 증가된 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강식품 조성물과는 상이하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 발효에 의해 프로토카테큐산이 증가된 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 상기 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 솔잎 추출액을 발효시켜 프로토카테큐산(protocatechuic acid)이 증가되는 것을 특징으로 하는 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 솔잎 추출액을 발효시켜 프로토카테큐산(protocatechuic acid)이 증가되는 것을 특징으로 하는

솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 본 발명의 발효 전과 비교하여 증가된 함량을 갖는 프로토카테큐산(protocatechuic acid)을 포함하는 솔잎 발효액은 심혈관계 질환의 예방 및 치료를 위한 약학조성물 또는 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 솔잎발효액의 에틸아세테이트(EtOAc) 층에서 혈전 분해 활성이 우수한 분획 F6.1 및 화합물 1을 분리하는 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 솔잎 발효액을 유기용매를 이용해 분리된 층을 이용하여 혈전 분해를 테스트한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 솔잎 발효액 에틸아세테이트 분획별 혈전 분해 테스트를 나타낸 것이다.

도 4는 솔잎 발효액 에틸아세테이트 분획별 TLC 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 솔잎 발효액 에틸아세테이트 분획 중 F5와 F6의 HPLC 결과를 나타낸 것이다. A: 분획 F6의 HPLC 결과, B: 분획 F5의 HPLC 결과. 분획 F6와 분획 F5는 동일 시간대에서 물질이 확인되었으나, 물질의 면적 값은 분획 F6가 우세하게 많은 것을 확인하였다.

도 6은 솔잎 발효액 에틸아세테이트 분획 중 F6.1의 ^{1}H NMR의 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 솔잎 발효액 에틸아세테이트 분획 중 F6.1의 ^{13}C NMR의 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 솔잎 발효액 에틸아세테이트 분획 중 F6.1의 ^{1}H NMR과 ^{13}C NMR의 결과에 따른 물질의 분자구조를 나타낸 것이다.

도 9는 솔잎 발효액에서 발효 진행에 따른 프로토카테큐산의 확인 및 양적 변화를 나타낸 것이다.

A는 프로토카테큐산 (Sigma), B는 솔잎 발효액 SFPE1, C는 솔잎 발효액 SFPE3, D는 솔잎 발효액 SFPE6, 적색 박스는 프로토카테큐산 피크를 나타낸다.

도 10은 솔잎 발효액의 프로토카테큐산의 면적을 분석한 것이다. 발효가 진행됨에 따라 프로토카테큐산의 양의 증가를 HPLC에서 분석된 면적 값으로 확인하였다. 프로토카테큐산은 Sigma사에서 구매한 물질이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 솔잎 추출액을 발효시켜 프로토카테큐산(protocatechuic acid)이 증가되는 것을 특징으로 하는 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에 따른 솔잎 발효액을 수득하기 위한 솔잎 추출물은 아황산가스의 오염을 최소화하기 위해 해발 350m 이상에서 자란 청정지역의 건강한 소나무를 선택하여 영양상태가 좋은 가지 부분을 채취한 후 싱싱하고 푸른 솔잎만을 선별한 다음 통상적인 방법을 통해 추출하여 수득할 수 있다. 바람직하게는 물 추출방법, 물-알코올 추출방법 또는 알코올 추출방법을 사용할 수 있다.

[0016] 상기 솔잎 추출물의 발효는 일반적인 자연 발효 또는 발효조 탱크를 이용한 발효일 수 있으며, 바람직하게는 자연 저장 발효일 수 있고, 본 발명에 따른 솔잎 발효액은 4~8개월 동안, 바람직하게는 6개월 동안 발효시켜 수득한 것을 사용할 수 있다.

[0017] 본 발명자들은 솔잎 발효액에서 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 활성 물질을 분리하기 위해, 솔잎 발효액의 에틸아세테이트 층에서 분획을 분리하는 과정을 거쳐 프로토카테큐산이라는 물질을 분리하였다.

[0018] 상기 심혈관계 질환은 콜레스테롤 및 중성지방이 혈관에 축적되어 발생하는 질환 또는 혈전에 의해 발생하는 질환일 수 있으며, 상기 심혈관계 질환은 혈전, 고혈압, 고지혈증, 뇌경색, 노인성 치매, 동맥경화증, 부정맥, 협심증, 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 심근경색이 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 바람직하게는 혈전이다.

[0019] 본 발명의 솔잎 발효액은

[0020] (a) 솔잎을 물에 담근 후 2~5회 세척하고, 다시 숯을 우려낸 물로 1~2회 세척하는 단계;

[0021] (b) 상기 솔잎을 탈수시키고, 착즙한 액을 2~4시간 동안 저온 분리하여 상징액을 수득하는 단계; 및

[0022] (c) 상기 상징액을 25~30℃의 진탕 배양기에서 240~300 rpm으로 4~8개월 동안 배양하여 발효시켜 수득할 수 있으며,

[0023] 바람직하게는

[0024] (a) 솔잎을 물에 담근 후 3~4회 세척하고, 다시 숯을 우려낸 물로 1회 세척하는 단계;

[0025] (b) 상기 솔잎을 탈수시키고, 착즙한 액을 3시간 동안 저온 분리하여 상징액을 수득하는 단계; 및

[0026] (c) 상기 상징액을 25~30℃의 진탕 배양기에서 270 rpm으로 6개월 동안 배양하여 발효시켜 수득할 수 있다.

[0027] 본 발명의 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 발효액을 0.02 내지 80 중량%, 바람직하게는 0.02 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 발효액을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하여 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 발효액의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 발효액을 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. 발효액을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 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 발효액에 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 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 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.

[0031] 본 발명의 발효액의 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 발효액은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 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.

[0032] 본 발명의 발효액은 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, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0033] 본 발명은 또한, 솔잎 추출액을 발효시켜 프로토카테큐산(protocatechuic acid)이 증가되는 것을 특징으로 하는 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0034] 본 발명의 건강기능식품에서, 상기 프로토카테큐산은 솔잎 발효액의 에틸아세테이트 층에서 분리한 것일 수 있

다.

[0035] 상기 심혈관계 질환은 혈전, 고혈압, 고지혈증, 뇌경색, 노인성 치매, 동맥경화증, 부정맥, 협심증, 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 심근경색이 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 바람직하게는 혈전이다.

[0036] 본 발명의 건강기능식품에서, 솔잎 발효액의 제조 방법은 전술한 바와 같다.

[0037] 상기 발효액을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.

[0038] 식품 또는 음료 중의 상기 발효액의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0039] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 발효액을 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, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0040] 상기 외에 본 발명의 발효액은 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. 그 밖에 본 발명의 발효액들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] **실험방법**

[0043] **1. 솔잎 발효액의 제조**

[0044] 솔잎은 청정지역(해발 350 m 이상)에서 자란 건강한 소나무를 선택하여 영양상태가 좋은 가지 부분을 채취한 후 싱싱하고 푸른 잎만 선별하여 사용하였다. 솔잎의 불순물이 녹아 나오도록 맑은 물에 담근 후 맑은 물이 나올 때까지 3~4회 세척하고, 다시 숯을 우려낸 물로 1회 세척하였다. 그 다음 솔잎 표면의 수분이 완전히 제거될 때까지 탈수시키고, 탈수된 솔잎을 녹즙기를 이용하여 착즙하였다. 착즙된 솔잎 액을 섬유소 층과 상징액을 저온(3 ~ 4℃)에서 3시간 동안 방치하여 섬유소 층과 상징액이 분리되도록 하였다. 분리된 상징액을 수득하여(이하 솔잎 엑기스) 결정이 생기지 않도록 -70℃ 이하의 냉동고에서 저장하였다. 솔잎 엑기스를 30℃ 진탕 배양기에서 270 rpm으로 6개월 동안 배양하여 발효시켰다.

[0045] **2. 솔잎 발효액의 물질분리**

[0046] 솔잎 발효액을 감압 농축기(BUCHI Rotavapor R114, Rotary vaccum evaporator, 180c, 280 rpm)를 이용하여 농축된 솔잎 발효액을 획득하였다. 농축된 솔잎 발효액을 유기용매인 에틸아세테이트와 물을 1:1 비율로 혼합한 후 분획 깔때기를 이용하여 에틸아세테이트 층과 물 층을 분리시킨 후 에틸아세테이트 층만 분리하고, 에틸아세테이트 층만 다시 감압 농축기를 이용하여 농축시켰다. 에틸아세테이트 층을 분리하기 위해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(10×13 cm; 63200 um particle size)를 이용하였고, 농도 구배는 n-헥산:아세톤 비율을 6:1에서부터 0:1까지 조절하여 총 9개의 분획을 분리하였다.

[0047] **3. 피브린 플레이트 분석을 이용한 혈전 분해 활성**

[0048] 먼저 피브린 아가로스 플레이트는 두께가 1 mm가 되도록 만들었다. 조성은 20 mM tris-HCl (pH 8.0) 버퍼를 1% 아가로스로 15 ml가 되도록 만들고, 20 mM tris-HCl 버퍼에 30 mg/ml가 되도록 인간 피브리노겐 용액을 3 ml 만들었다. 20 mM tirs-HCl 버퍼에 인간 트롬빈 100 unit/ml가 되도록 18 ul를 만들고, 상온에서 1시간 동안 두고 아가로스를 굳혔다. 그 다음 피브린 플레이트에 5 mm 직경의 구멍을 만들기 위해 유리관(glass tube)을 이용하여 조심스럽게 구멍을 만들고, 샘플 20 ul를 주입하였다. 그 다음 37℃ 인큐베이터에서 3~5시간 동안 관찰하였다. 그리고 샘플에서 혈전이 분해되어 나타내는 투명 환의 직경을 측정하였다. 스트렙토키나제(100 unit/ml;Sigma)는 대조구로 샘플과 동일한 양(20 ul)을 주입하였다.

[0049] **4. TLC를 이용한 혈전 분해 활성**

[0050] TLC용 플레이트는 Merck사의 TLC 실리카겔 60 F_{254}를 사용하였다. TLC의 농도 구배는 메탄올과 물의 비율을 3:2로 하여 TLC를 분석하였다.

[0051] **5. HPLC를 이용한 물질 분리**

[0052] HPLC는 길슨(GILSON)의 HPLC를 사용하였다. 사용된 컬럼은 YMC사의 ODS-H80 컬럼(20×150 mm, 4 um particle size, Japan)을 사용하였고, 분리에 사용된 유기용매는 메탄올을 사용하였다. 물은 HPLC 사용 전 0.1% 포름산(formic acid)을 포함시키고, 초음파를 이용하여 기포를 제거하였다. HPLC 조건은 0-25, 42-45분;33% 메탄올과 28-28분 100% 메탄올 조건으로 분석하였다. 유속(flow rate)은 3 ml/min로 하였으며, 검색 UV 값은 205 nm, 참고 UV는 254 nm를 사용하였다.

[0053] **6. NMR을 이용한 물질 분석**

[0054] Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy(Varian Inova 500 MHz spectrometer) 분석은 ^{1}HNMR, ^{13}CNMR spectroscopy로 분석하였다. NMR 분석 $CDCl_3$을 위해 사용된 용매는 Cambridge Icotope Lab., USA에서 구매하여 사용하였다.

[0055] **7. HPLC를 이용한 솔잎 발효액의 발효 진행에 따른 프로토카테큐산 변화량 조사**

[0056] HPLC 분석 조건은 0~25분 아세트니트릴 15%, 29~37분 아세트니트릴 100%, 41~46분 아세트니트릴 15%의 조건을 주었으며, 컬럼은 1 ml을 사용하였으며, UV는 260 nm와 289 nm를 사용하였다. 용매 흐름은 분당 1 ml가 되게 하였다. HPLC는 최초 프로토카테큐산의 확인은 동일 기계를 사용하였다.

[0057]

[0058] **실시예 1: TLC와 HPLC를 이용한 활성 물질 분리**

[0059] 물질의 전체 분리과정은 도 1과 같은 과정을 수행하였다. 솔잎 발효액 SFPE4를 건조시켜 214g을 획득하였고, 부탄올과 에틸아세테이트를 물과 동일 부피로 하여 분리하였다. 에틸아세테이트 분획은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 농도 구배를 n-헥산:아세톤 비율을 6:1에서부터 0:1까지 조절하여 총 9개의 분획을 분리하였다. 혈전 분해 활성 테스트 후 이중 다시 혈전 분해가 좋은 분획 Fraction 6(F6)을 획득하였고, 다만 Fraction 5(F5) 역시 혈전 분해 활성이 있었으나 F6보다는 약함을 확인하였다.

[0060] F5와 F6의 HPLC의 용매 비율을 확인하기 위해 TLC를 수행하였으며, 분획 F5와 F6의 TLC 분석은 메탄올:물의 비율은 3:2의 비율이 분리도가 가장 좋은 것을 확인하였다(도 4). RP-HPLC 분석을 위해 ODS-H80 칼럼을 사용하였다. HPLC 조건은 0~25분, 42~45분에 메탄올 33%, 28~28분에 메탄올 100%로 HPLC을 수행하였고, 사용된 물은 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였다. 유속은 분당 3ml로 하였으며, UV는 205nm와 254nm를 사용하였다. HPLC 결과 F5에서는 5개, F6에서는 3개의 분획을 획득하였다(도 5). F6.1과 F6.2는 한 개의 점으로 TLC 결과 확인되었고, 분획 F5.1과 F5.2에서도 관찰되었다. TLC 분석 비율을 토대로 RP-HPLC를 수행하였고, UV 205nm와 UV 254nm에서 확인된 피크를 혈전 테스트에 사용하였다.

[0061] 분획 F5와 F6은 다시 HPLC와 TLC 분석을 통해 F5는 5개로 분획 F6은 3개의 추가 분획으로 나누어 졌고, HPLC

분석 결과 retentation time 17.8분에 동일한 피크가 확인되었다.

[0062] **실시예 2: 피브린 플레이트 분석을 이용한 혈전 분해 활성 테스트 결과**

[0063] 유기용매를 이용해 분리된 물 층, 부탄올 층, 에틸아세테이트 층을 피브린 플레이트 분석을 이용하여 혈전 분해 활성을 테스트한 결과, 도 2에서 보는 바와 같이 에틸아세테이트(EtOAc) 분획이 다른 분획보다 혈전 분해 활성이 월등히 강한 것으로 확인되었다. 또한, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 분리된 9개의 분획을 피브린 플레이트 분석을 이용하여 혈전 분해가 좋은 물질을 검색한 결과, 도 3에 보는 바와 같이 분획 F5와 F6이 혈전 분해 활성이 우세하였으나, 분획 F6이 더 강한 활성이 있는 것으로 확인되었다.

[0064] **실시예 3: NMR을 이용한 분획 F6.1의 구조 분석 결과**

[0065] 혈전 분해 활성이 우수한 분획 F6.1을 정제하여 ^{1}H NMR과 ^{13}C NMR spectroscopy를 통해 확인하였다. 먼저, ^{1}H NMR (500 MHz) 분석결과는 도 6에서 보는 바와 같이, 양성자의 chemical shift와 coupling pattern을 각각 확인하였다. 위치 2번은 δ_H 7.49 (d, *J*=7.5 Hz), 위치 3번은 δ_H 6.91 (d, *J*=7.5 Hz), 위치 6번은 δ_H 7.55 (brs) 값을 확인하였고, 이들은 양성자가 하나만 존재하는 것을 알 수 있었다. 즉, 기본 구조는 벤젠 링 구조를 이루고 있는 것을 확인하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼 분석결과는 도 7에서 보는 바와 같이, 7개의 탄소를 가지고 있으며, 위치 7번은 카보실 탄소 구조임을 알 수 있으며, 나머지 탄소의 위치 1~6번은 벤젠 링의 탄소임을 알 수 있다. 위치 1번과 2번, 위치 3번과 4번, 그리고 위치 5번과 6번은 이중 결합을 하고 있는 것을 확인하였다. 먼저, 카보실 탄소 위치 7번은 δ_C 168.2, 위치 1번은 δ_C 122.9, 위치 2번은 δ_C 123.8, 위치 3번은 δ_C 115.8, 위치 4번은 δ_C 150.7, 위치 5번은 δ_C 145.5 이며 위치 6번은 δ_C 117.5를 확인하였다. NMR 분석결과는 7번 탄소가 카보실 탄소구조를, 위치 3번과 위치 4번 탄소는 각각 수산기와 결합하고 있는 것을 알 수 있다. 3개의 양성자 결합 값은 벤젠 링의 기본 구조를 가지고 있는 것을 알 수 있다. 위치 1번과 2번, 위치 3번과 4번, 위치 5번과 6번 탄소들은 이중 결합을 하고 있으며, 기본 화학식은 $C_7H_6O_4$이며, 분자량은 154.0266와 155.0300 두가지로 존재할 수 있으나, 후자의 분자량이 존재할 수 있는 확률은 7.6%로 전자의 분자량이 더 우세하게 존재할 수 있는 것을 알 수 있다.

[0066] 이러한 데이터 결과를 종합해서 혈전 분해 활성이 가장 좋은 분획 F6.1은 3,4-디히드록시벤조산(프로토카테큐산)라는 것을 ^{1}H NMR과 ^{13}C NMR spectroscopy를 통해 확인할 수 있었다(도 8).

[0067] **실시예 4: 솔잎 발효액의 발효 진행에 따른 프로토카테큐산 변화량 조사**

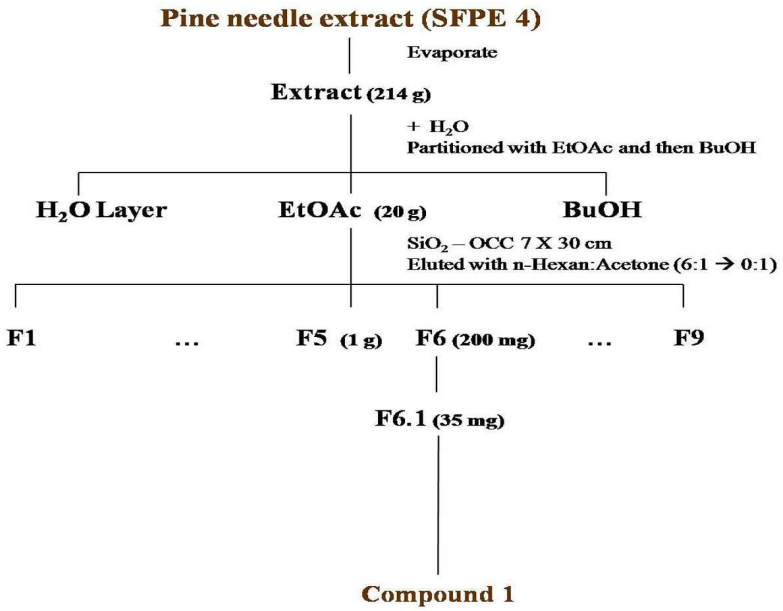
[0068] 솔잎 발효액의 발효 진행에 따른 프로토카테큐산의 변화량을 확인하였다. 사용된 솔잎 발효액은 발효가 진행 중인 SFPE1, SFPE3, SFPE6와 시그마(sigma)에서 구매한 프로토카테큐산을 비교하였다.

[0069] 물질 분리는 재료 및 실험방법에서 사용한 방법과 동일한 과정을 거쳐 에틸아세테이트 층에서 프로토카테큐산의 존재를 확인하였다. HPLC 분석 조건은 0~25분 아세트니트릴 15%, 29~37분 아세트니트릴 100%, 41~46분 아세트니트릴 15%의 조건을 주었으며, 칼럼은 1ml을 사용하였으며 UV 260nm와 289nm를 사용하였다. 용매흐름은 분당 1ml이 되게 하였다. HPLC는 최초 프로토카테큐산을 확인 동일 기계를 사용하였다.

[0070] SFPE1(발효 경과 1년), SFPE3(발효 경과 3년)와 SFPE6(발효 경과 6년)에서 피크(도 9의 A, B, C, D의 적색 박스)를 확인할 수 있었다(도 9). 프로토카테큐산의 양은 발효가 진행됨에 따라 그 양이 증가하는 것을 확인하였고, SFPE1에서는 33.7%, SFPE3에서는 49.0%, SFPE6에서는 63.7%가 존재하는 것을 확인하였다(도 10).

도면

도면1

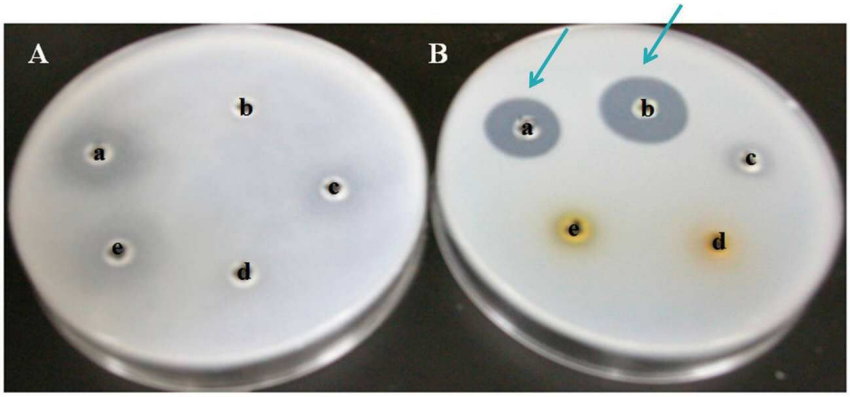


도면2

(diameter: mm)

Fraction	Effect is time dependent			
	30 min	1 hour	2 hours	3 hours
EtOAc fr.	10	15	19	21
BuOH fr.	6.5	12	14	16
Water fr.	5	11	–	–
SFPE 4	5	11	13	17
H_2O:DMSO=5:1*	–	–	–	–
Streptokinase**	–	6	9	10

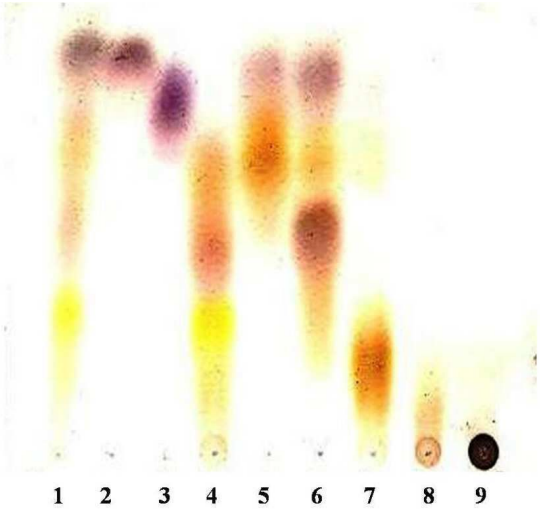
도면3



A, SFPE 4 and Fraction F1-F4;
lane a, SFPE 4
lane b, Fraction F1
lane c, Fraction F2
lane d, Fraction F3
lane e, Fraction F4

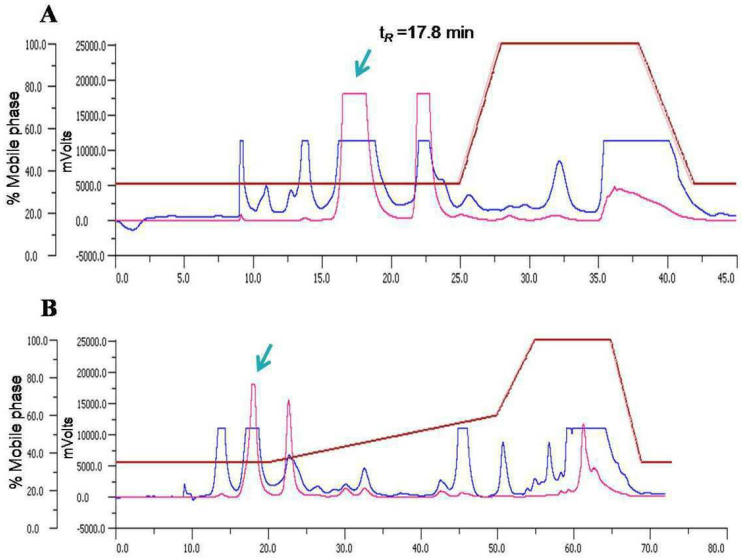
B, Fraction F5-F9;
lane a, Fraction F5
lane b, Fraction F6
lane c, Fraction F7
lane d, Fraction F8
lane e, Fraction F9

도면4

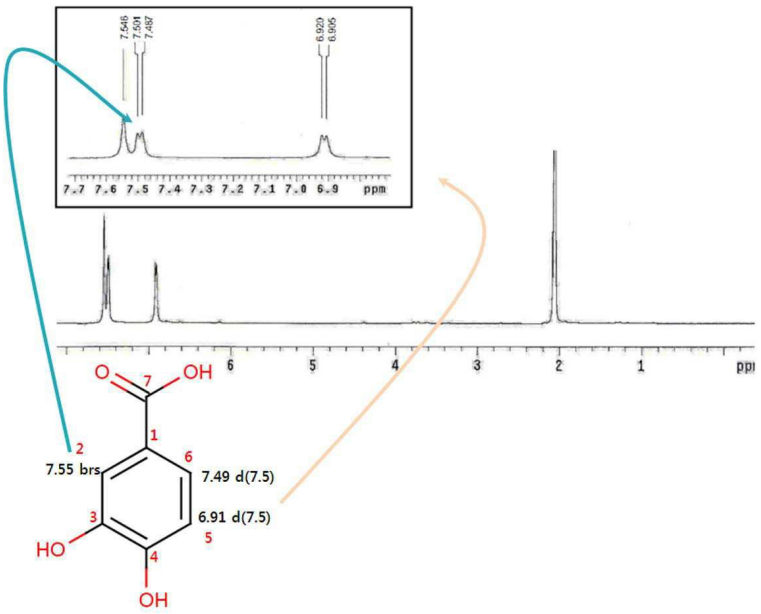


1. Fraction of F6
2. Fraction of F6.1
3. Fraction of F6.2
4. Fraction of F6.3
5. Fraction of F5.1
6. Fraction of F5.2
7. Fraction of F5.3
8. Fraction of F5.4
9. Fraction of F5.5

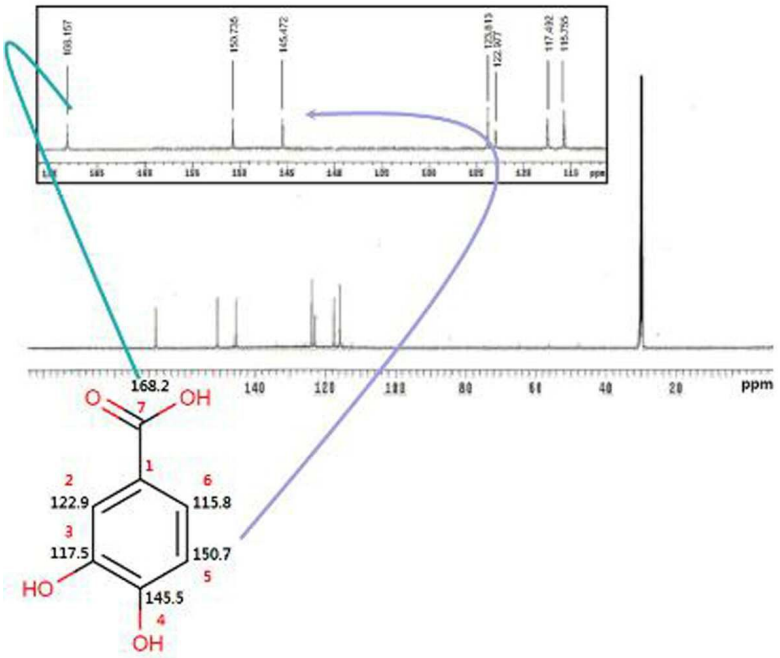
도면5


A
t_R=17.8 min
% Mobile phase
mVolts
B
% Mobile phase
mVolts

도면6

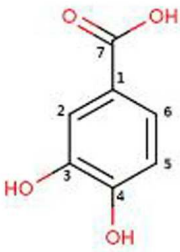

7.546
7.501
7.487
6.929
6.905
7.7 7.6 7.5 7.4 7.3 7.2 7.1 7.0 6.9 ppm
6 5 4 3 2 1 ppm
O
7
OH
1
2
6
7.55 brs
7.49 d(7.5)
3
6.91 d(7.5)
5
HO
4
OH

도면7



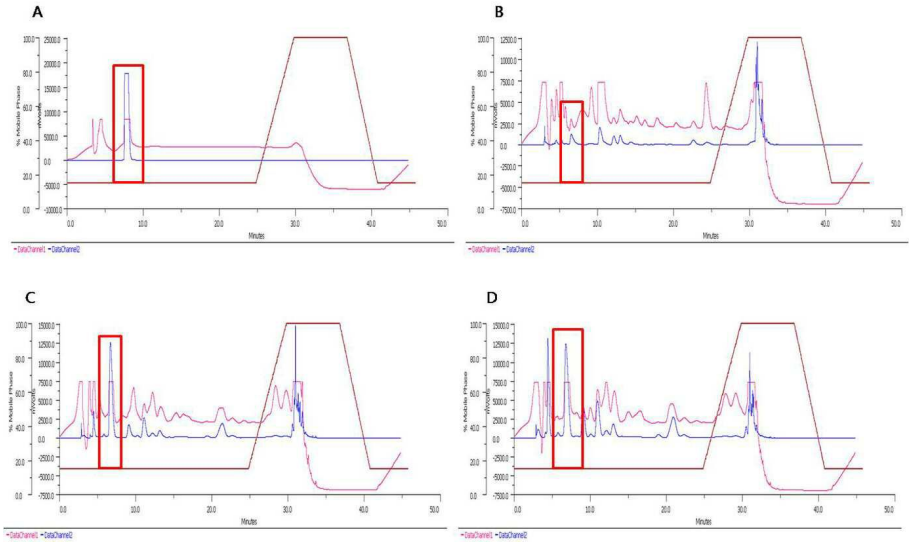
도면8

Position	δ_H mult. (J in Hz)	δ_C
1		123.8
2	7.49 d (7.5)	115.8
3	6.91 d (7.5)	150.7
4		145.5
5		117.5
6	7.55 brs	122.9
7		168.2

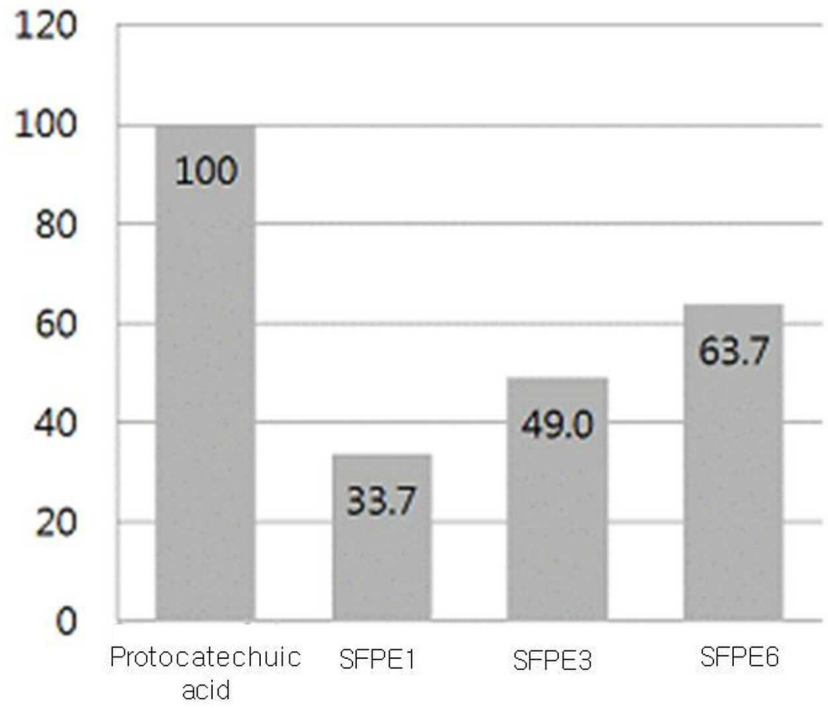


Chemical structure of 3,4-dihydroxybenzoic acid isolated from F6.1 of SFPE 4.
Formula: $C_7H_6O_4$
Exact Mass: 154.0266
m/e: 154.0266 (100.0%), 155.0300 (7.6%).

도면9


A
B
C
D

도면10


120
100
80
60
40
20
0
100
33.7
49.0
63.7
Protocatechuic acid
SFPE1
SFPE3
SFPE6