(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0113433
(43) 공개일자 2015년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/27 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0036963
(22) 출원일자 2014년03월28일
심사청구일자 2014년03월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김미정
서울특별시 강북구 삼양로19길 113 삼각산아이원아파트 114-2001
김영준
서울 서초구 효령로77길 20, 1107호 (서초동, 현대이에스에이아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

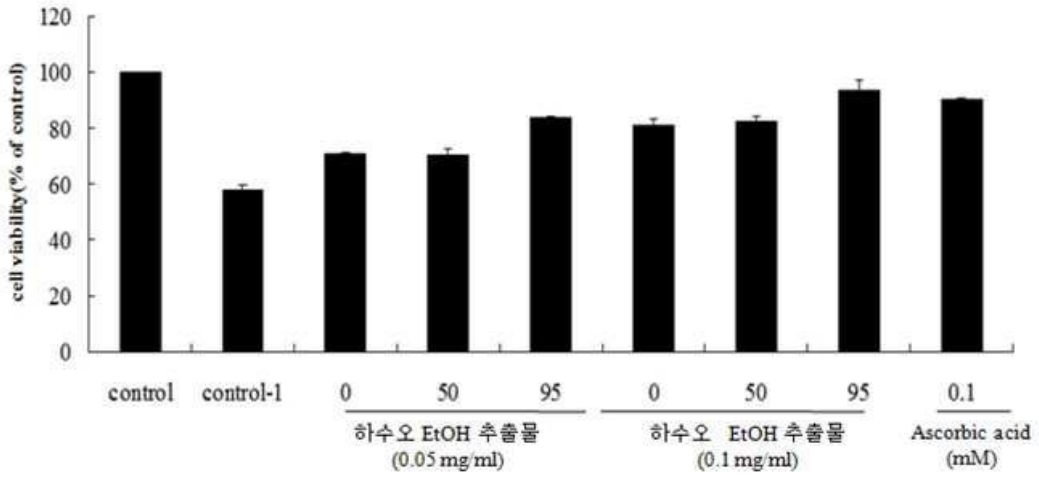
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **하수오 추출물을 포함하는 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 하수오 추출물의 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료를 위한 신규 용도를 제공한다. 본 발명의 하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 퇴행성 뇌질환의 원인 중 하나인 베타 아밀로이드(amyloid beta)에 의한 세포 독성으로부터 뇌신경세포를 보호하고, 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과 및 뇌기능 개선 효과가 뛰어나, 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

김형민

울산 동구 남목7길 36, 3동 108호 (서부동, 남목우주아파트)

윤호근

경기도 고양시 덕양구 소만로 49, 801동 205호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013011686
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	(이공)일반연구자-여성과학자
연구과제명	[1차년도] 다양한 천연물 가공법을 이용한 고 효율성 우울증 개선 소재 개발
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2014.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환 및 파킨슨 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환의 예방 및 치료를 위한 것인 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 하수오 추출물은 하수오의 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물의 추출물인 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 유기용매는 저급 알코올, 헥산, 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 및 디에틸에테르로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매인 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 하수오 추출물은 하수오의 저급 알코올 추출물인 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 하수오 추출물은 하수오의 에탄올 추출물인 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 하수오 추출물은 하수오의 헥산 추출물인 약제학적 조성물.

청구항 8

하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 식품 조성물은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환 및 파킨슨 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환의 예방 및 개선을 위한 것인 식품 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 하수오 추출물은 하수오의 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물의 추출물인 식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 유기용매는 저급 알코올, 헥산, 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 및 디에틸에테르로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매인 식품 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 하수오 추출물은 하수오의 저급 알코올 추출물인 식품 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 하수오 추출물은 하수오의 에탄올 추출물인 식품 조성물.

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 하수오 추출물은 하수오의 헥산 추출물인 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 하수오 추출물의 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료를 위한 신규 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 치매는 인간 본성이 파괴되며 장기간에 걸쳐 진행되는 퇴행성 질환이기 때문에 환자를 수용하는 수동적인 방법으로는 사회 경제적 부담을 감당할 수가 없으므로 예방제 및 원인 치료제를 개발하는 적극적인 시도를 해야 한

다. 그러나 현재까지는 알츠하이머 질환의 근본적인 발병원인을 치료할 수 있는 치료제는 개발되어 있지 않으며, 일반적인 치료제로서 사용 가능한 것으로는 아세틸콜린 에스테라제 저해제인 화이자사의 아리셉트(Aricept), 노바티스사의 엑셀론(Exelon), 그리고 얀센사의 레미닐(Reminyl)과 최근에 미국 FDA로부터 허가를 받은 NMDA 수용체의 길항제 기전의 룬드벡사의 에빅사(Ebixa; Memantine)가 있다. 그러나 아세틸콜린 에스테라제 저해제의 경우는 감퇴된 인지 능력을 개선해 줄 뿐 알츠하이머 질환의 근본적인 발병 원인을 치료하지는 못한다. 또한, 단지 일부 환자의 경우에서 일시적인 증세 완화 효과를 보이며, 그 약효가 오래 지속되지 못하므로 근본적인 치료제라 하기 어렵다. 또한 질환의 특성상 장기 복용을 요하게 되는데, 상기 의약품들의 경우 간 독성, 구토, 식욕감퇴를 비롯한 여러 가지 부작용을 수반하는 것 또한 문제점으로 드러나고 있다. 따라서 질환의 진행 과정을 막아 줄 수 있는 치료제의 개발이 시급한 과제가 되고 있다. 이를 위해서 많은 다국적 제약회사들이 이 분야에 대한 연구 개발에 막대한 투자를 하고 있으며 특히 알츠하이머 질환의 근본적인 발병 원인으로 추정되고 있는 40여개의 아미노산으로 구성된 베타 아밀로이드의 생성량을 감소 시키거나 베타 아밀로이드에 의하여 유발되는 뇌신경세포 사멸에 대한 저해제의 개발 연구가 진행되고 있다. 국내의 경우 알츠하이머 질환에 대한 기초 연구는 어느 정도 이루어지고 있으나 치매 치료제 개발 그 자체의 경우는 미비한 실정이라고 여겨진다.

[0003] 산화적 스트레스(oxidative stress)는 체내 활성 산소종(ROS)이 많이 생성되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되면서 체내 산화계와 항산화계의 불균형으로 일어나는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 1). 생활수준이 향상되고 인간의 수명이 증가함에 따라 노화 및 노화에 관련된 각종 질병에 관심이 커지고 있으며 산화적 스트레스가 알츠하이머 증후군 및 파킨슨 증후군과 같은 중추신경계의 퇴행성 뇌질환의 중요한 요인으로 밝혀졌다(비특허문헌 2; 비특허문헌 3).

[0004] 한편, 하수오는 하수오 또는 적하수오로 불리며 다년생 덩굴성 초본으로 기원이 마디풀과의 식물인 적하수오(Polygonum multiflorum)의 덩이 뿌리이다. 주산지는 중국의 하남, 호북, 귀주, 사천 강소, 광서등지에 분포하며 그 외 절강, 안징, 광동, 산동, 강서, 호남에서도 서식한다 (비특허문허 4). 예로부터 간, 신장을 보호하고 혈을 자양하며 풍을 제거하는 효능이 있다고 알려져 있으며 머리가 일찍 희어지는데, 허리와 무릎 아픈데, 자궁출혈, 만성 학질, 설사, 만성간염, 용종 등에도 효능을 나타낸다고 알려져 있다. 또한 장기 복용시 혈압 강하, 동맥경화 방지 등의 효과를 나타내어 예로부터 민간 요법에 많이 이용되어 왔으며 항산화 효과, 심장 보호효과, 항노화 및 항 돌연변이 효과, 관절통, 피부감염 등에 효능이 있는 것으로 보고되고 있다 (비특허문헌 5; 비특허문헌 6; 비특허문헌 7; 비특허문헌 8).

[0005] 적하수오의 뿌리에는 크리소페놀(chrysophenol), 에모딘(emodin), 레인(rhein), 피지션(physcion) 및 이들의 배당체와 2,3,5,4‘-테트라하이드록시스틸벤, 2-o-β-D-글루코피라노사이드 및 2’-o-모노갈로일 에스터, 3'-모노갈로일 에스터, 3'-o-모노칼로일 에스터 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 9).

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Jeong GS et al, Planta Medica, 74, pp.1368-1373, 2008

(비특허문헌 0002) Jin DQ et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 331: 1264-1269, 2005

(비특허문헌 0003) Lim CS et al, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29: 1212-1216, 2006

(비특허문헌 0004) Chan YC, Wang MF, Chang HC. Polygonum multiflorum extracts improve cognitive performance in senescence accelerated mice. Am J Chin Med 31: 171-179 (2003)

(비특허문헌 0005) Yim TK, Wu WK, Mak DH, Ko MW. Myocardial protective effect of an antharaquinone-containing extract of Polygonum multiflorum ex vivo. Planta Med 64: 607-611 (1998)

(비특허문헌 0006) Kuo YD, Sun CM, Ou JC, Tsai WJ. A tumor cell growth inhibitor from Polygonum hypolencum Ohwi. Life Sci 61: 2335-2344 (1997)

(비특허문헌 0007) Zhang H, Jeong BS, Ma TH. Antimutagenic property of an herbal medicine, Polygonum multiflorum Thunb detected by the Tradescantia micronucleus assay. J Environ Pathol Toxicol Oncol 18: 127-130 (1999)

(비특허문헌 0008) Li RW, David LG, Myers SP, Leach DN. Anti-inflammatory activity of Chinese

medicinal vine plants. J Ethnopharmacol 85: 61-67 (2003)

(비특허문헌 0009) Seo H, Seo GY, Ko SZ, and Park YH, Inhibitory Effects of Ethanol Extracts from Polygoni multiflori radix and Cynanchi wilfordii radix on Melanogenesis in Melanoma Cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 40(8), 1086-1091(2011)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료를 위해 사용되어 온 기존의 약물들을 대체할 수 있는 천연물 유래의 성분을 발굴하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료 효과가 높은 천연물 유래 조성물을 제조하고자 노력하였다. 그 결과 하수오 추출물이 퇴행성 뇌질환의 발생 원인 중 하나인 베타 아밀로이드(amyloid beta)에 의한 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과와 뇌신경세포보호 활성 및 뇌기능 개선 효과가 뛰어남을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명은 하수오 추출물의 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료를 위한 신규 용도, 하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료용 약제학적 조성물, 치료상 유효량의 하수오 추출물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료방법을 제공한다.

[0010] 하기 실시예에서는, 하수오 추출물이 라디칼 소거능이 매우 우수하며, ROS에 의한 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호 활성과 베타아밀로이드 펩타이드에 의해 유발되는 신경 독성에 대한 신경세포 보호 활성이 뛰어남을 보여준다. 따라서, 하수오 추출물은 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료용 조성물의 유효성분으로서 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명에 따른 조성물은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 헌팅턴 질환 등의 퇴행성 질환의 예방, 개선 및 치료를 위해 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 기억력 개선 또는 인지능력 개선과 같은 뇌기능 개선을 위해서도 사용될 수 있다. 하수오 추출물은 예로부터 민간요법에서 이용되어 오던 인체에 무해한 성분으로서 부작용이 없을 뿐만 아니라 베타아밀로이드에 의해 유발되는 뇌신경세포 사멸을 직접적으로 억제해주므로 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 하수오 추출물의 제조를 위해 사용되는 하수오는 백하수오, 적하수오 등을 모두 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 하수오의 뿌리를 사용할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명에 있어서 "하수오 추출물"은 압착법 또는 용매 추출법에 의해 추출물을 모두 포함한다. 본 발명의 한 구체예에 있어서, 상기 하수오 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물을 추출 용매로서 이용하여 하수오로부터 추출된 것일 수 있다. 이 때 사용되는 유기용매의 종류나 물과 유기용매의 혼합 비율은 특별히 제한되지 않는다.

[0013] 예를 들어, 상기 유기용매는 저급 알코올, 헥산, 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 및 디에틸에테르로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매일 수 있다. 상기 저급 알코올은 탄소수 1 내지 6의 알코올일 수 있다. 예를 들어, 저급 알코올로는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 또는 에틸렌글리콜 등을 이용할 수 있다. 유기용매는 이 외에도 아세트산, DMFO(dimethyl-formamide), DMSO(dimethyl sulfoxide) 등의 극성 용매, 아세토나이트릴, 에틸 아세테이트, 메틸 아세테이트, 플루오로알칸, 펜탄, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, o-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 클로로포름, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소 및 THF(Tetrahydrofuran) 등의 비극성 용매를 사용할 수도 있다.

[0014] 한 구체예에서, 상기 하수오 추출물은 하수오의 열수 추출물 또는 저급 알코올 추출물일 수 있다. 바람직하게는 하수오의 에탄올 추출물일 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 하수오 추출물은 하수오의 헥산 추출물일 수 있다.

본 명세서에서, 유기 용매의 추출물은 유기용매 단독 또는 유기용매와 물의 혼합 용매를 추출용매로 이용하여 추출한 것을 모두 포함한다. 예를 들어, 하수오의 에탄올 추출물은 에탄올 단독을 추출 용매로 사용한 추출물뿐만 아니라, 물과 에탄올의 혼합 용매를 이용하여 추출한 추출물도 포함한다.

[0015] 예를 들어, 본 발명의 하수오 추출물은 건조된 하수오에 중량의 10배 내지 20배, 바람직하게는 15배(w/v)의 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올 등의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 5 내지 95% 에탄올에 가열추출법, 초음파 추출법, 환류 추출법 등의 통상적인 추출방법, 바람직하게는 가열추출법으로 70 내지 120℃, 바람직하게는 80 내지 110℃에서 1 내지 6시간, 바람직하게는 3 내지 5시간 동안 추출하는 제 1단계; 상기 단계에서 수득한 추출물을 여과하여 감압 농축하는 제 2단계; 이를 -50℃내지 -30℃에서, 바람직하게는 -45℃ 내지 -25℃에서, 24 내지 72시간, 바람직하게는 40 내지 55시간동안 동결 건조하는 제 3단계의 제조방법을 통하여 본 발명의 하수오 추출물을 수득할 수 있다.

[0016] 본 명세서에서 사용되는 용어 '추출물'은 추출물을 추가적으로 분획(fractionation)한 분획물도 포함한다. 즉, 하수오 추출물은 상술한 추출용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다. 또한, 상기 추출물이나 분획물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 하수오 추출물에 포함된다.

[0017] 한 구체예에서, 상기 하수오 추출물은 하수오의 유기용매 추출물을 제2의 유기용매로 재분획한 분획물일 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 하수오 추출물은 하수오의 저급 알코올 추출물을 제2의 유기용매로 재분획한 분획물일 수 있다. 예를 들어, 상기 하수오 추출물은 하수오의 에탄올 추출물을 헥산으로 재분획한 분획물일 수 있다.

[0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 '하수오 추출물'은 하수오에 추출용매를 처리하여 얻은 조추출물뿐만 아니라 하수오 추출물의 가공물도 포함한다. 예를 들어, 하수오 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.

[0019] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 하수오 추출물을 0.01 내지 50% 중량으로 포함할 수 있다. 이러한 조성은 이에 한정되는 것은 아니며, 하수오 추출물의 농도, 본 발명의 조성물이 투여되는 대상체의 상태, 질환의 종류 및 진행 정도 등에 따라 변할 수 있다.

[0020] 한편, 본 명세서에서 용어 '유효성분으로 포함하는'이란 하수오 추출물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 조성물 내에서 하수오 추출물은 예를 들어, 0.01 mg/ml 이상, 바람직하게는 0.05 mg/ml 이상, 보다 바람직하게는 0.1 mg/ml 이상, 보다 더 바람직하게는 1 mg/ml 이상 포함된다. 하수오 추출물은 천연물로서 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물 내에 포함되는 하수오 추출물의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0021] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적 조성물 또는 식품 조성물로 활용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0023] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0024] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다.

[0025] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다

른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0026] 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0027] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여이다.

[0028] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-10g/kg이다.

[0029] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명은 또한 하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 알코올 음료류, 과자류, 다이어트바, 유제품, 육류, 초코렛, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

[0032] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분으로서 하수오 추출물뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 본 발명의 하수오 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0033] 본 발명은 상기 하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 식품 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 건강기능식품이란, 하수오 추출물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 이와 같은 건강기능식품에 있어서의 하수오 추출물의 첨가량은, 대상인 건강기능식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 환제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태의 건강기능식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량% 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다. 한 구체예에서, 본 발명의 건강기능식품은 환제, 정제, 캡슐제 또는 음료의 형태일 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 상기 하수오 추출물의 용도를 제공한다. 상기한 바와 같이 하수오 추출물은 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0035] 또한 본 발명은 포유동물에게 유효량의 하수오 추출물을 투여하는 것을 포함하는 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료 방법을 제공한다.

[0036] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을

말한다.

[0037] 여기에서 사용된 용어 "유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 해당 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 유효량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 예방, 치료 또는 개선 방법에 있어서, 성인의 경우, 하수오 추출물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.001 ㎎/㎏ 내지 10g/㎏의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명의 치료방법에서 하수오 추출물을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 퇴행성 뇌질환의 원인 중 하나인 베타 아밀로이드(amyloid beta)에 의한 세포 독성으로부터 뇌신경세포를 보호하고, 산화적 스트레스에 대한 항산화 효과 및 뇌기능 개선 효과가 뛰어나, 뇌신경세포 보호 및 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 하수오의 물 및 에탄올 추출물의 라디칼 소거능을 나타낸다(0: 0% 하수오 열수 추출물, 50: 50% EtOH 하수오 추출물, 95: 95% EtOH 하수오추출물, 시료의 최종농도: 1mg/ml).

도 2는 하수오의 물 및 에탄올 추출물의 세포 독성에 대한 효과를 나타낸다(Control: 무처리 대조군, 0: 하수오 열수 추출물, 50: 50% EtOH 하수오 추출물, 95: 95% EtOH 하수오추출물, 시료의 최종농도: 0.05 ㎎/ml 및 0.1 ㎎/ml).

도 3은 하수오의 물 및 에탄올 추출물의 라디칼로부터의 신경세포 보호 활성을 나타낸다(Control: 무처리 대조군, control-1: H_2O_2 처리 (0.2 ㎜, 6hr), 0: 하수오 열수 추출물, 50: 50% EtOH 하수오 추출물, 95: 95% EtOH 하수오 추출물).

도 4는 하수오의 물 및 에탄올 추출물의 베타 아밀로이드 펩타이드로부터의 신경세포 보호 활성을 나타낸다(Control: 무처리 대조군, control-1: 베타 아밀로이드 0.025 ㎜ 처리 (24 hr), 0: 하수오 열수 추출물, 50: 50% EtOH 하수오 추출물, 95: 95% EtOH 하수오 추출물).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0042] **실시예 1. 하수오의 열수 추출물의 제조**

[0043] 건조시킨 하수오 시료 3.2 ㎏에 정제수 36 L를 가하여 100℃에서 4시간 동안 가열추출하고 여액을 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 -40℃에서 48시간 동안 동결 건조시켜 본 발명의 하수오 열수 추출물을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0044] **실시예 2. 하수오의 에탄올 추출물의 제조**

[0045] **2-1. 하수오의 50% 에탄올 추출물의 제조**

[0046] 건조시킨 하수오 시료(3.2 kg)에 50% 에탄올 36 L를 가하여 84℃에서 4시간 동안 가열추출하고 여액을 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 -40℃에서 48시간 동안 동결건조시켜 본 발명의 하수오 50% 에탄올 추출물을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0047] **2-2. 하수오의 95 % 에탄올 추출물의 제조**

[0048] 건조시킨 하수오 시료(3.2 kg)에 95% 에탄올 36 L를 가하여 82℃에서 4시간 동안 가열추출하고 여액을 감압 농축하여 동결건조기를 이용하여 -40℃에서 48시간 동안 동결건조시켜 본 발명의 하수오 95% 에탄올 추출물 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0049] **실험예 1. 라디칼 소거능 실험**

[0050] 상기 실시예에서 수득한 시료의 전자 공여 전달 능력을 측정하기 위해 DPPH방법 (Blios, M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. 395. Nature 26: 1199-1200 (1958))을 이용하여 하기와 같이 라디칼 소거능 실험을 수행하였다.

[0051] 상기 실시예에서 수득한 시료들을 에탄올 용액에 1 mg/ml의 농도로 녹인 후, 0.02 ml을 96-웰 플레이트에 각각 옮긴 후 에탄올에 녹인 0.25 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, D9132, Sigma) 0.18 ml을 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도 값을 측정하였으며, 하기 수학식 1에 따라 라디칼 소거능을 계산하여 결과를 나타내었다. 양성대조군은 항산화활성이 매우 뛰어난 EGCG 1 mM (E4268, Sigma)를 사용하였다.

[0052] [수학식 1]

[0053] 라디칼 소거능 (%) = {(흡광도$_{(대조군)}$-흡광도$_{(시료)}$)/흡광도$_{(대조군)}$}×100

[0054] 도 1은 하수오의 물 및 에탄올 추출물의 라디칼 소거능을 보여준다 (0: 하수오 열수 추출물, 50: 50%EtOH 하수오 추출물, 95: 95% EtOH 하수오 추출물, 시료의 최종농도: 1 mg/ml).

[0055] 실험결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 하수오 추출물은 라디칼 소거능이 뛰어난 양성대조군 EGCG와 유사한 효과를 나타남을 확인할 수 있었다.

[0056] **실험예 2. 세포독성 실험**

[0057] 상기 실시예에서 수득한 시료의 세포독성을 실험하고자 MTT assay 법(Yun-Lian Lina, Guei-JaneWang, Chuen-Lin Huan, Yi-Chao Lee, Wei-Chen Liao, Wen-Lin Lai, Yen-Ju Lin, Nai-Kuei Huan,.J. Ethnopharmacology, 122; 417-425 (2009))을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0058] PC12 세포 (rat pheochromocytoma cell, American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA))을 10% 우태아혈청 (FBS, Gibco-BRL ((Gaithersburg, MD)) 및 1% antimicotics/antibiotics (Gibco-BRL)를 함유한 RPMI-1640 배지(Gibco-BRL)에서 배양하여 세포수가 10^4-10^6 세포/ml이 되도록 배양하였다.

[0059] 배양 세포들을 96-웰 플레이트로 옮겨 주어 세포수가 웰당 1x10^4로 배양한 다음, 상기 실시예에서 수득한 하수오 추출물을 5% DMSO에 0.5 mg/ml 및 1 mg/ml 녹인 후, 각각 15 ㎕씩 넣고 (최종 농도가 0.05 mg/ml 및 0.1 mg/ml) 24 시간 37℃에서 반응시킨 후, PBS에 녹인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, M2128, Sigma) 시약 2 mg/ml을 각 웰당 15 ㎕씩 넣은 후 37℃에서 90분간 반응 후 570nm/630nm 에서 흡광도 값을 측정한 후, 하기 수학식 2을 이용하여 계산하였다. 대조군은 시료를 전혀 처리하지 않고 측정하였으며, 양성대조군으로는 항산화 활성이 좋고 세포 독성이 낮은 아스코르빅산 (A5960, Sigma)을 5% DMSO에 1 mM 이 되도록 녹인 후 세포에 최종 농도가 0.01 mM 및 0.1 mM되도록 처리하여

측정하였다.

[0060] [수학식 2]

[0061] 세포 생존율(%) = (흡광도$_{(시료)}$/흡광도$_{(대조군)}$)× 100

[0062] 도 2는 하수오의 물 및 에탄올 추출물의 세포 독성에 대한 효과를 보여준다 (Control: 무처리 대조군, 0: 하수오 열수 추출물, 50: 50% EtOH 하수오 추출물, 95: 95% EtOH 하수오추출물, 시료의 최종농도: 0.05 mg/ml 및 0.1mg/ml, Ascorbic acid: 아스코르빅산(양성대조군))

[0063] 도 2에 나타난 바와 같이, 하수오 추출물 시료 모두 세포 독성이 없음을 확인할 수 있었다.

[0064] **실험예 3. 신경세포 보호 활성의 측정**

[0065] 상기 실시예에서 수득한 혼합 시료의 과산화수소에 의해 생성되는 ROS에 의한 독성으로부터의 신경세포 보호 활성을 실험하고자 Xiao-Qing Tang 등의 방법(Xiao-Qing Tang, Jian-Qiang Feng, Jin Chen, Pei-Xi Chen, Jun-Li Zhi, Yu Cui, Rui-Xian Guo, Hui-Min Yu; Brain Research, 1057 57-64(2005))을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0066] PC12 세포를 96-웰 플레이트에 antimicotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에 배양하여 세포수가 웰당 $1x10^4$이 되었을 때, 상기 실시예에서 수득한 하수오 추출물을 1mg/ml의 농도로 5% DMSO에 녹인 후, 각각 15 ㎕씩 넣고 24시간 37℃에서 전처리(pre-incubation)한 후, 0.2 mM H_2O_2 를 6 시간 처리하여 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유도한 후, 상기 실험예 2의 MTT 어세이법을 이용하여 신경세포 보호 활성을 측정하였다. 대조군(control)은 시료를 아무것도 처리하지 않았으며, 음성대조군(control-1)은 0.2 mM H_2O_2 6시간, 양성대조군은 아스코르빅산 0.01 mM 및 0.1 mM을 전처리하여 측정하였다.

[0067] 도 3은 하수오의 물 및 에탄올 추출물의 라디칼로부터 신경세포 보호 활성을 보여준다(Control: 무처리 대조군, control-1: H_2O_2 처리 (0.2 mM, 6hr), 0; 하수오 열수 추출물, 50: 50% EtOH 하수오 추출물, 95: 95% EtOH 하수오 추출물). 실험결과, 도 3에 나타난 바와 같이, H_2O_2 에 의해 유발된 ROS에 의한 산화적 스트레스로 인하여 세포 활성이 60% 정도로 낮아졌으며, 하수오의 95% 에탄올 추출물에서 세포 보호 효과에 대해 높은 보호 활성을 나타냄을 보였다.

[0068] **실험예 4. 베타 아밀로이드 펩타이드에 의해 유발되는 신경 독성에 대한 신경세포 보호 활성의 측정**

[0069] 상기 실시예에서 수득한 혼합 시료의 베타 아밀로이드에 의한 뇌신경 독성으로부터 신경세포 보호 활성을 실험하고자 Rong 등의 방법(Rong Ma, Nian Xiong, Chengfang Huang, Qiang Tang, Benrong Hu, Jizhou Xiang, Gang Li, Neuropharmacology, 56: 1027-1034 (2009))을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0070] PC12 세포를 96-웰 플레이트에 antimicotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에 배양하여 세포수가 웰당 $1x10^4$이 되었을 때, 상기 실시예에서 수득한 하수오 추출 시료를 0.5 mg/ml 및 1mg/ml의 농도로 5% DMSO에 녹인 후, 각각 15 ㎕씩 넣고 24시간 37℃에서 전처리(pre-incubation)한 후, 0.025 mM β-아밀로이드 (25-35) (A4559, Sigma)를 24 시간 처리하여 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유도한 후, 상기 실험예 2의 MTT 어세이법을 이용하여 신경세포 보호 활성을 측정하였다. 대조군(control)은 시료를 아무것도 처리하지 않았으며, 음성대조군(control-1)은 베타 아밀로이드만을 처리, 양성대조군은 아스코르빅산 0.1 mM을 전처리하여 측정하였다.

[0071] 도 4는 하수오의 물 및 에탄올 추출물의 베타 아밀로이드 펩타이드로부터 신경세포 보호 활성을 보여준다 (Control: 무처리 대조군, control-1: 베타 아밀로이드(β-amyloid) 0.025 mM 처리 (24 hr), 0: 하수오 열수 추출물, 50: 50% EtOH 하수오 추출물, 95: 95% EtOH 하수오 추출물)

[0072] 도 4에 나타난 바와 같이, 베타 아밀로이드 펩티드에 의해 유발된 산화적 스트레스로 인하여 세포 활성이 60% 정도로 낮아졌으며, 하수오의 95% 에탄올 추출물에서 세포 보호 효과에 대해 높은 보호 활성을 나타냄을 보였다.

[0073] 이하, 본 발명의 추출물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0074] **제제예 1. 산제의 제조**

[0075] 하수오 열수 또는 에탄올 추출물 20 mg

[0076] 유당 100 mg

[0077] 탈크 10 mg

[0078] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0079] **제제예 2. 정제의 제조**

[0080] 하수오 열수 또는 에탄올 추출물 10 mg

[0081] 옥수수전분 100 mg

[0082] 유당 100 mg

[0083] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0084] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0085] **제제예 3. 캅셀제의 제조**

[0086] 하수오 열수 또는 에탄올 추출물 10 mg

[0087] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0088] 락토오스 14.8 mg

[0089] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0090] 통상의 캅셀제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캅셀제를 제조한다.

[0091] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0092] 하수오 열수 또는 에탄올 추출물 10 mg

[0093] 만니톨 180 mg

[0094] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0095] $Na_2HPO_4,12H_2O$ 26 mg

[0096] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ㎖) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0097] **제제예 5. 액제의 제조**

[0098] 하수오 열수 또는 에탄올 추출물 20 mg

[0099] 이성화당 10 g

[0100] 만니톨 5 g

[0101] 정제수 적량

[0102] 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 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0103] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

[0104] 하수오 열수 또는 에탄올 추출물 1000 mg

[0105] 비타민 혼합물 적량

[0106] 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

[0107] 비타민 E 1.0 mg

[0108] 비타민 B1 0.13 mg

[0109] 비타민 B2 0.15 mg

[0110] 비타민 B6 0.5 mg

[0111] 비타민 B12 0.2 ㎍

[0112] 비타민 C 10 mg

[0113] 비오틴 10 ㎍

[0114] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0115] 엽산 50 ㎍

[0116] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0117] 무기질 혼합물 적량

[0118] 황산제1철 1.75 mg

[0119] 산화아연 0.82 mg

[0120] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0121] 제1인산칼륨 15 mg

[0122] 제2인산칼슘 55 mg

[0123] 구연산칼륨 90 mg

[0124] 탄산칼슘 100 mg

[0125] 염화마그네슘 24.8 mg

[0126] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0127] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0128] 하수오 열수 또는 에탄올 추출물 1000 mg

[0129] 구연산 1000 mg

[0130] 올리고당 100 g

[0131] 매실농축액 2 g

[0132] 타우린 1 g

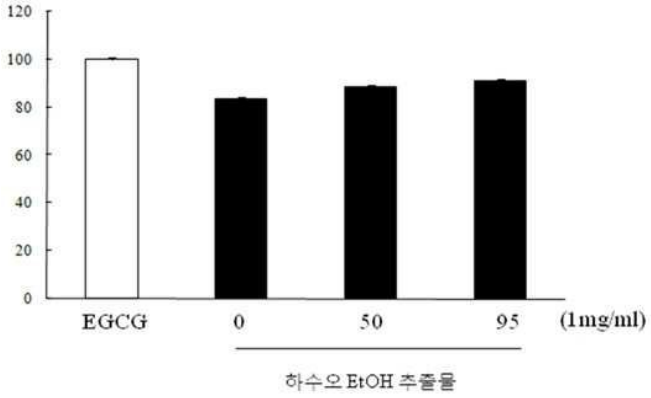
[0133] 정제수를 가하여 전체 900 ㎖

[0134] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

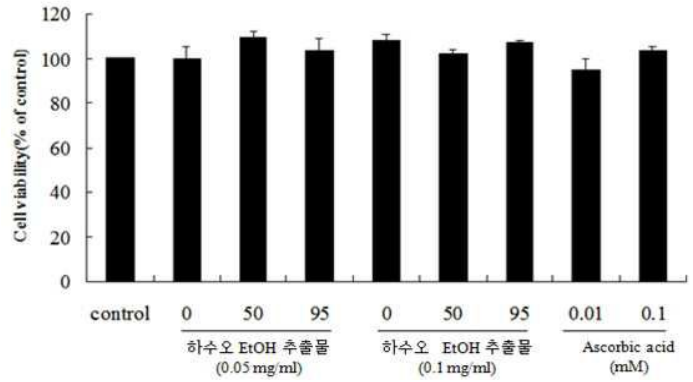
[0135] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

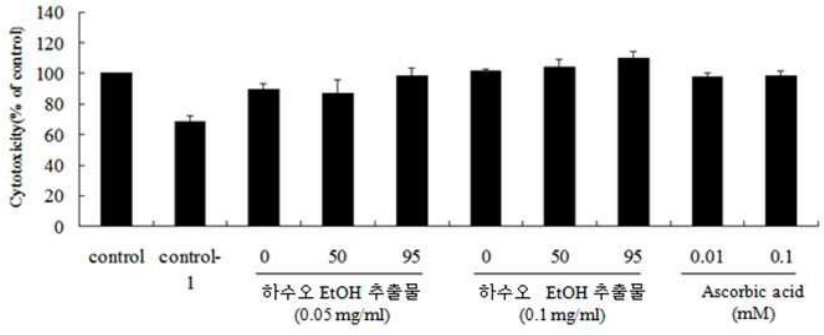
도면1



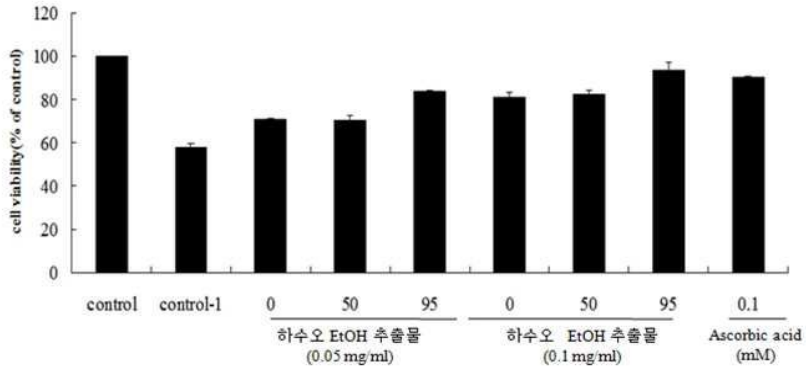
도면2



도면3



도면4


120
100
80
60
40
20
0
cell viability(% of control)
control
control-1
0
50
95
0
50
95
0.1
하수오 EtOH 추출물
(0.05 mg/ml)
하수오 EtOH 추출물
(0.1 mg/ml)
Ascorbic acid
(mM)