



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0109207
(43) 공개일자 2010년10월08일

(51) Int. Cl.

A23K 1/14 (2006.01) *A23K 1/16* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0027696

(22) 출원일자 2009년03월31일

심사청구일자 2009년03월31일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

김상겸

서울 영등포구 양평동 삼호아파트 1동 2307호

박창식

충남 공주시 신관동 대아아이투빌아파트 105-401

(74) 대리인

신동인

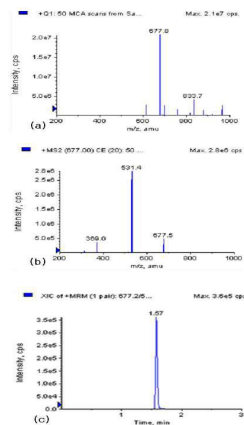
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 항산화 활성을 갖는 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물을 이용한 동물의 사육방법

(57) 요약

본 발명은 항산화 및 생식력 강화 활성을 갖는 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai) 건조분말 또는 이의 추출물을 이용한 동물의 사육방법에 관한 것으로, 본 발명의 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물은 항산화 효과를 가지고 있어 인간에게는 육질 개선, 이취 감소 및 각종 성인병 예방의 이익을, 가축에게는 소화력 증진, 사육 기간 단축, 사료비 절감 및 면역력 증대로 인한 각종 질병 예방의 이익을 주며, 또한, 음양곽의 유효성분인 이카린은 동물의 생식력 강화 및 자양강장의 기능을 부여하여 모체의 번식률을 높이는 효과를 발휘하므로 농가소득 증대에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai)을 분쇄하여 건조분말로 만드는 제 1단계; 상기 건조분말을 사료에 5 내지 10% 함량으로 배합하는 제 2단계; 상기 사료를 동물에 자유 채식토록 급여하여 기능성 산물을 생산하는 제 3단계를 포함하는 항산화 및 생식력 강화 활성을 갖는 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물을 이용한 동물의 사육방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 음양곽 건조분말을 배합한 사료의 구성배합비가 사료 : 음양곽 건조분말= 15 ~ 20 : 0.1 ~ 10의 중량비(w/w)임을 특징으로 하는 동물의 사육방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

본 발명은 항산화 및 생식력 강화 활성을 갖는 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai) 건조분말 또는 이의 추출물을 이용한 동물의 사육방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] [문헌 1] Bayir H. et al., *Crit Care Med.*, 33(12 Suppl), pp.S498-501, 2005
- [0003] [문헌 2] Niles et al., *Nitric Oxide*, 14, pp.109-121, 2006
- [0004] [문헌 3] Yen GC et al., *J. Agric. Food Chem.*, 43, pp.27-32, 1995
- [0005] [문헌 4] De Souza LC. et al., *Bioorg. Med. Cehm. Lett.*, 14, pp.5859-5861, 2004
- [0006] [문헌 5] Pike J. et al., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 65, pp.117-120, 1995
- [0007] [문헌 6] Estrela et al., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 43(2), pp.143-181, 2006
- [0008] [문헌 7] Prior RL. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 53, pp.4290-4302, 2005
- [0009] [문헌 8] DeLange and Glazer, *Anal Biochem.*, 28, pp.300-306, 1989
- [0010] [문헌 9] Tanaka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, pp.2530-2536, 2001
- [0011] [문헌 10] Ghiselli et al., *Free Radical Biol. Med.*, 18, pp.29-36, 1995
- [0012] [문헌 11] Winston et al., *Free Radical Biol. Med.*, Feb., 24(3), pp.480-493, 1998
- [0013] [문헌 12] Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156(2), pp.96-105, 1999
- [0014] [문헌 13] Halliwell B. et al., *Annu. Rev. Nutr.*, 16, pp.33-50, 1996
- [0015] [문헌 14] Brannen et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 52, pp.59-63, 1975
- [0016] [문헌 15] Ito N. et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, p.343, 1983; Chan KM. et al., *J. Food Sci.*, 58, pp.1-4, 1993
- [0017] [문헌 16] Larson RA. et al., *Phytochemistry*, 27, pp.969-978, 1988

- [0018] [문헌 17] 中谷延二, *日本食品工業學會誌*, 37, p.569, 1990
- [0019] [문헌 18] 條原和毅, *食品と開發*, 27, p.29, 1992
- [0020] [문헌 19] Kang SS. et al., *Natural product science. Seoul Univ. Publishers*, Seoul, p.71, 1988
- [0021] [문헌 20] Huson B. et al., *Food Chem.*, 19, pp.537-541, 1987
- [0022] [문헌 21] Frankel, E.N. et al., *Food Chem.*, 57, p.51, 1996
- [0023] [문헌 22] Giese J. et al., *Food Technol.*, 5, pp.73-81, 1996
- [0024] [문헌 23] Pszczola DE. et al., *Food Tech.*, 55, pp.51-59, 2001
- [0025] [문헌 24] Halliwell B. et al., *FASEB J.*, 2, pp.2867-2870, 1988
- [0026] [문헌 25] 박종희, *한약백과도감*, 신일상사, pp.643-645, 2002
- [0027] [문헌 26] Ning et al., *Urology*, 68, pp.1350-1354, 2006
- [0028] [문헌 27] Winston and Cederbaum, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 9(2), pp.95-102, 1985

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0029] 산소와 관련된 인체 내 산화성물질을 활성산소종(ROS: reactive oxygen species)과 활성질소종(RNS: reactive nitrogen species)이라고 하는데 이러한 ROS 및 RNS의 종류로는 슈퍼옥사이드(superoxide), 히드록실(hydroxyl), 페록실(peroxyl), 알콕실(alkoxyl), 히드로페록실(hydroperoxyl)과 같은 자유라디칼(유리기, free radical)과 히드로젠페록사이드(hydrogenperoxide), 히포클로로스산(hypochlorous acid), 오존(ozone), 일중항 산소(singlet oxygen), 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite) 등과 같은 비(非)자유라디칼(비유리기, non free radical)이 있다. 이 중에서 반응성이 강하여 직접적인 독성을 유발하는 것은 히드록실, 페록실, 퍼옥시나이트라이트 등이다(Bayir H. et al., *Crit Care Med.*, 33(12 Suppl), pp.S498-501, 2005; Niles et al., *Nitric Oxide*, 14, pp.109-121, 2006).
- [0030] 산화성물질들은 다양한 생물체의 산화 환원 반응에서 생성되며, 식용유지의 변질 또는 여러 생체물질(지질, 단백질, 핵산, 탄수화물)에 산화적인 손상을 유발할 수 있으며 여러 단계를 거치게 되면서 결과적으로 세포에 손상을 유발할 수 있다(Yen GC et al., *J. Agric. Food Chem.*, 43, pp.27-32, 1995). 생체막 구성성분인 인지질의 불포화지방산은 활성산소종과 같은 자유라디칼에 의해 과산화 반응이 개시되며 또한 연쇄적으로 진행된다. 그러므로 자유라디칼에 의한 과산화반응은 세포막의 투과성을 향진시킬 뿐 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유도하여 발암과정에도 관여한다. 라디칼 작용은 산화적 스트레스와 관련된 질환인 아토피성 질환, 암, 고혈압, 심근경색, 동맥경화, 류머티스, 백내장, 파킨슨씨병 등 여러 가지 만성질환의 진행에 많은 영향을 주며(De Souza LC. et al., *Bioorg. Med. Cehm. Lett.*, 14, pp.5859-5861, 2004), 면역계 기능을 약화시키는 요인으로 작용될 수 있다(Pike J. et al., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 65, pp.117-120, 1995).
- [0031] 생명체가 반복적으로 산화적 스트레스에 노출될 경우 세포는 이에 대응하기 위해 항산화 활성을 갖는 효소나 물질의 생성을 증가시켜 생체를 보호하게 된다. 이런 생체의 보호기작을 항산화 체계(antioxidant defense system)라하며 크게 항산화 효소와 저분자의 항산화 물질로 구분된다. 항산화 효소와 저분자의 항산화 물질은 상호 보완적으로 작용하여 생체에서 생성되는 산화성물질을 무독화시킨다. 특히 글루타치온(glutathione)은 대표적인 저분자의 항산화 물질로 직접적으로 산화성물질을 환원시킬뿐만 아니라 글루타치온 S-전달효소(glutathione S-transferase)와 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase)의 기질로 작용하여 친전자성 물질을 무독화시킨다(Estrela et al., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 43(2), pp.143-181, 2006).
- [0032] 최근 천연물 추출물 등에서 총체적인 항산화활성을 측정하기 위한 다양한 시도가 진행되고 있다(Prior RL. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 53, pp.4290-4302, 2005). 시료의 총항산화 활성측정은 활성산소종에 의한 독성에 대한 저항성을 판단하는데 유효하며 이 목적을 위해 몇 가지 방법이 개발된 바 있다(Prior RL. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 53, pp.4290-4302, 2005). 1980년대 중반에 자유기 생성물질과 항산화물질을 함유한 실험

계에서 최대산소소비에 요하는 시간을 측정하여 그 결과를 수용성 비타민 E 유도체인 트록스(Trolox)로 측정된 시간과 비교하는 TRAP(total radical trapping antioxidant parameter)법이 개발되었다(DeLange and Glazer, *Anal Biochem.*, 28, pp.300-306, 1989). 그 후 라디칼이 형광물질에 주는 화학적 손상에 의한 형광의 감소로 항산화 활성을 측정하는 방법이 제시되었다(Tanaka et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 123, pp.2530-2536, 2001). 라디칼에 의한 형광물질의 형광감소속도는 일정하지만 항산화물질이 존재 시에는 일시적인 지연이 관찰된 후 형광의 감소가 신속하게 일어난다. 따라서 시료와 대조군의 AUC의 차이를 측정하는 ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity) 측정법과 항산화 물질이 존재할 때 형광물질의 보호시간, 즉 유도기(lag-phase)를 측정하는 방법 등이 개발되었다(Ghiselli et al., *Free Radical Biol. Med.*, 18, pp.29-36, 1995). 그러나 이들 방법은 모두 생체내에서 발생하는 라디칼이 아닌 인공적인 라디칼을 이용함으로써 생체에서의 항산화 활성을 평가하는 데 한계를 가지고 있다(Prior RL. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 53, pp.4290-4302, 2005).

[0033] 레굴리(Regoli)와 윈스턴(Winston)은 생체내 산화성물질과 반응하여 에틸렌으로 산화되는 KMBA(α -keto- γ -methiolbutyric acid)를 사용하여 생체 조직과 천연물의 항산화 활성을 측정하는 방법을 개발하였다(Winston et al., *Free Radical Biol. Med.*, Feb., 24(3), pp.480-493, 1998; Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Apr., 15, 156(2), pp.96-105, 1999). 에틸렌은 밀폐된 반응용기 내에서 공기 시료를 취해 가스 크로마토그래피로 정량할 수 있다. 이 방법의 장점은 활용성에 있는데 KMBA는 다양한 산화성 물질 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical), 과옥실 라디칼(peroxyl radical), 과산화질산염(peroxynitrite), 차아염소산(hypochlorous acid) 등과 반응하여 에틸렌을 생성하므로 항산화활성이 높은 조직이나 혈액 시료에서는 에틸렌의 발생이 저해된다. 이 방법에서는 KMBA와 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical), 과옥실 라디칼(peroxyl radical), 과산화질산염(peroxynitrite) 등과의 반응에 의해 발생하는 에틸렌의 농도를 반응시간의 변화에 따라 측정하여 AUC(area under the curve)를 구하고 대조군과 투여군에서의 AUC의 비율로부터 TOSC를 산출한다. 따라서 단일 반응시점에서만 측정되는 방법이 가지고 있는 오차를 보정할 수 있는 재현성이 높고 정확한 방법이다. 시료로부터 측정된 TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 이 측정값은 기기의 감도나 사용 시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다. 더욱이 생체에서 실제로 생성되는 산화성물질에 대한 항산화 활성을 평가함으로써 생물체의 적용 가능성이 높은 방법이다(Ghiselli A. et al., *Free Radical Biol. Med.*, 18, pp.29-36, 1995).

[0034] 자유라디칼로부터 인체를 보호하는 협동적인 방어시스템은 산화를 저해시키는 영양소와 효소를 가지고 있다(Halliwell B. et al., *Annu. Rev. Nutr.*, 16, pp.33-50, 1996). 산화적인 스트레스로부터 인체를 보호하는 효과적인 방법 중 하나는 항산화 수준을 증가시키는 것이다(De Souza LC. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, pp.5859-5861, 2004). 따라서 산화적 손상으로부터 예방하기 위한 대체 물질의 항산화적인 평가는 매우 활발하게 연구되고 있다.

[0035] 항산화제는 산소를 제거하거나 흡수하는 것이 아니라 자유라디칼과 반응함으로써 특정 비타민류와 필수 아미노산등의 손실을 최소화 하거나, 유지 제품의 산패를 지연 또는 방지하는 목적으로 사용된다. 식품 또는 의약품 등에 많이 사용되는 합성 항산화제로는 부틸화 하이드록시아니솔(BHA, Butylated hydroxyanisole), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT, Butylated hydroxytoluene), 프로필 갈레이트(PG, Propyl galate), 터셔리부틸 하이드로퀴논(TBHQ, Teritiarybutyl hydroquinone) 등이 있으나, 이들을 실험동물에 고농도로 투여할 경우에는 간 비대증이 유발되거나 발암성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 부틸화 하이드록시톨루엔은 여러 연구 결과를 통하여 실험동물의 간에서 마이크로솜 효소 활성(microsomal enzyme activity)을 증가시킨다는 것이 알려지면서, 이들 페놀계 합성 항산화제의 안전성에 대하여 논란이 제기되어 현재에는 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다(Brannen et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 52, pp.59-63, 1975; Ito N. et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, p.343, 1983; Chan KM. et al., *J. Food Sci.*, 58, pp.1-4, 1993).

[0036] 이에 따라 항산화 효과가 높으면서 안전하고 경제적인 식물기원의 천연 항산화제를 개발하고자 하는 많은 연구가 기대 속에 이루어지고 있다(Larson RA. et al., *Phytochemistry*, 27, pp.969-978, 1988). 최근 천연물을 대상으로 한 연구가 활발히 수행되면서 천연물에 함유되어 있는 2차 대사산물이 생리활성물질로서 주요 관심사가 되고 있으며 특히, 항산화성 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(中谷延二, *日本食品工業學會誌*, 37, p.569, 1990). 생리활성물질은 매우 적은 양으로도 현저한 활성을 나타내는 고부가가치 물질로서 많은 종류가 유용하게 쓰이고 있으며, 새로운 물질들에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다(條原和毅, *食品と開發*, 27, p.29, 1992; Kang SS. et al., *Natural product science. Seoul Univ. Publishers*, Seoul, p.71, 1988).

[0037] 현재까지 알려진 천연 항산화 물질로는 토코페롤(tocopherol)류, 플라보노이드(flavonoid)류, 고시폴(gossypol), 세사몰(sesamol), 오리자놀(oryzanol) 및 비타민 C 등을 들 수 있다(Huson B. et al., *Food*

Chem., 19, pp.537-541, 1987; Frankel, E.N. et al., *Food Chem.*, 57, p.51, 1996; Giese J. et al., *Food Technol.*, 5, pp.73-81, 1996; Pszczola DE. et al., *Food Tech.*, 55, pp.51-59, 2001). 이 중 토코페롤(tocopherol)과 L-아스코르브산(L-ascorbic acid)이 천연 항산화제로 선호되고 있는데, 그중 토코페롤은 안전성이 높으나 단독으로는 산화반응 저지 능력이 낮으며(Halliwell B. et al., *FASEB J.*, 2, pp.2867-2870, 1988) 가격이 비싸다는 단점이 있다.

[0038] 음양곽(淫羊藿)은 매자나무과의 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)의 전초이며, 다른 이름으로는 강전(剛前), 건계근(乾鷄筋), 기장초(棄杖草), 방장초(放杖草), 삼지구엽초(三枝九葉草), 선령비(仙靈脾), 천량금(千兩金) 및 황련조(黃連祖) 등이 있다. 줄기와 잎으로 되어있으며, 줄기는 가늘고 원주형이며 표면은 황록색~담황색이고 광택이 있다. 줄기에 붙은 잎은 대생(對生)이며 2회 3출 복엽이다. 소엽(小葉)은 난원형이며, 길이 3~13cm, 직경 2~7cm이며, 잎 끝은 약간 뾰족하다. 상면 표면은 황록색이며 하면 표면은 회록색이고 주맥은 7~9 줄이며 밑 부분에 가늘고 긴 털이 드문드문 있다. 냄새는 없으며 맛은 조금 쓰다. 음양곽은 발기부전, 유정, 자궁냉증, 사지냉증, 피부마비, 구안와사, 건망증, 반신불수, 허리와 무릎 연약증, 고혈압, 소아마비 등에 쓰이며, 약리작용으로 정액분비촉진, 혈압강하, 관상동맥 혈류량 증가, 혈당강하, 콜레스테롤강하, 면역기능증진, 진해, 거담, 평전, 진정작용, 역균, 소염작용 등이 보고되었다(박종희, 한약백과도감, 신일상사, pp.643-645, 2002).

[0039] 이카린(Icariin, $C_{33}H_{40}O_{15}$, 분자량 676.67)은 전통적으로 흔히 자양강장제로 사용되어온 음양곽으로부터 분리한 플라보노이드(flavonoid)이다. 소량의 다른 성분, 예를 들어 마그노플로린(magnoflorine), 쿠에렉틴(querectin), 에피메디(epimedin) A, B 및 C도 또한 음양곽으로부터 HPLC를 통하여 최근 검출되었다. 이카린은 표준 시험약제로서 주로 사용되고 있다. 피로회복, 면역기능증진, 노화방지, 간기능 향상에 관한 이카린의 일부 약리학적 연구가 최근 보고되었으며, 음경해면체 평활근에서 강한 이완작용을 가지고 있어 성기능을 향상시킬 뿐만 아니라, 혈관평활근 및 동맥혈관에서도 이완작용을 가지고 있으며, 그 작용기전은 산화질소(NO)의 생성 및 활성화를 증강시키며 PDE V형 효소에 대한 억제작용으로 평활근 세포의 cGMP 농도를 증가시켜 음경발기를 촉진시키고, 또한, 안전하고 유효하게 성기능 장애에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Ning et al., *Urology*, 68, pp.1350-1354, 2006).

[0040] 이에 본 발명자들은 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물의 항산화 활성을 TOSC 분석(assay)법을 이용한 옥시라디칼 소거능 평가 실험을 통하여 확인하였고, 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물 뿐만 아니라, 음양곽을 섭취한 돼지의 혈청 및 둔부조직에서 음양곽의 활성성분인 icariin을 분석함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

[0041] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 항산화 및 생식력 강화 활성을 갖는 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai) 건조분말 또는 이의 추출물을 이용한 동물의 사육방법을 제공한다.

[0042] 구체적으로, 본 발명은 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai)을 분쇄하여 건조분말로 만드는 제 1단계; 상기 건조분말을 사료에 5 내지 10% 함량으로 배합하는 제 2단계; 상기 사료를 동물에 자유 채식토록 급여하여 기능성 산물을 생산하는 제 3단계를 포함하는 항산화 및 생식력 강화 활성을 갖는 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물을 이용한 동물의 사육방법을 제공한다.

[0043] 상기 제 2단계에서, 음양곽 건조분말을 배합한 사료의 구성배합비가 바람직하게는 사료 : 음양곽 건조분말 = 15 ~ 20 : 0.1 ~ 10의 중량비(w/w), 보다 바람직하게는 사료 : 음양곽 건조분말 = 15 ~ 20 : 1 ~ 5의 중량비(w/w)로 배합됨이 바람직하고, 또한, 본 발명의 사료 총 중량에 대해 음양곽 건조분말은 0.5 내지 20%, 보다 바람직하게는 1 내지 15%, 가장 바람직하게는 5 내지 10%를 유효성분으로 함유함을 특징으로 한다.

[0044] 이하, 본 발명의 음양곽 건조분말 및 추출물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.

[0045] 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai)의 잎을 세척, 세절한 후에 음건, 건조기에 의한 건조, 동결건조, 열풍건조 등의 건조방법을 통하여 수득된 건조물을 분말화하는 분말화과정 등과 같은 당업계의 통상적인 제조공정을 통하여 본 발명의 건조분말을 수득할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 추출물은 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai)의 잎을 세절하고, 시료 중량의 약 1

내지 20배(v/w), 바람직하게는 약 5 내지 10배(v/w)의 정제수를 포함한 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 메탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 50 내지 90% 혼합비의 물 및 메탄올 혼합용매를 가하여 15℃ 내지 30℃, 바람직하게는 20℃ 내지 25℃ 추출온도에서 약 1시간 내지 10일, 바람직하게는 약 1시간 내지 5시간동안 1회 내지 5회 반복하여 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 가열추출 등, 바람직하게는 초음파 추출법으로 추출한 후, 농축 및 동결건조하는 제조공정을 통하여 본 발명의 추출물을 수득할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 항산화 및 생식력 강화 활성을 갖는 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물을 이용한 동물의 사육 방법은 하기와 같이 제공될 수 있다.

[0048] 구체적으로, 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai)을 분쇄하여 건조분말로 만드는 제 1단계; 상기 제 1단계에서 준비된 음양곽 건조분말은 시중에서 판매하는 동물사료에 배합하여 사용하는데, 음양곽 건조분말의 사용량은 사료 사용량 대비 그 구성배합비가 사료 : 음양곽 건조분말 = 15 ~ 20 : 0.1 ~ 10의 중량비(w/w), 바람직하게는 사료 : 음양곽 건조분말 = 15 ~ 20 : 1 ~ 5의 중량비(w/w)로 배합됨이 바람직하고, 또한, 본 발명의 사료 총 중량에 대해 음양곽 건조분말은 0.5 내지 20%, 보다 바람직하게는 1 내지 15%, 가장 바람직하게는 5 내지 10%를 사용하여 사료에 배합하는 제 2단계; 상기 제 2단계에서 배합된 음양곽 건조분말 배합 사료를 동물에 자유 채식토록하는 제 3단계의 과정을 통하여 본 발명의 항산화 및 생식력 강화 활성을 갖는 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물을 이용한 동물의 사육방법을 제공한다.

[0049] 상기 동물은 말, 돼지, 소, 양, 염소, 낙타 및 리마 등의 포유류; 적색 도미, 비늘돔, 바스타드 헬리벳(bastard halibut), 넙치, 방어, 방어 치어, 앰버 잭(amberjack), 참치, 황색 연어, 은어, 연어, 송어, 타이거 복어, 장어, 미꾸라지, 메기, 잉어 및 금붕어 등의 어류; 전복, 터번 셀, 가리비 및 굴 등의 패류; 참새우, 블랙타이거 새우, 황해 참새우 및 블루 크랩 등의 갑각류; 및 꿩, 닭, 오리, 칠면조 및 타조 등의 가금류의 양식 동물 및 개, 고양이 등의 애완동물을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 본 발명은 육상 동물 및 수중 동물에 광범위하게 적용될 수 있다.

[0050] 본원에서 정의되는 상기 음양곽의 유효성분인 이카린(Icariin)은 동물의 생식력 강화 및 자양강장의 기능을 부여함을 특징으로 한다.

효 과

[0051] 본 발명은 항산화 및 생식력 강화 활성을 갖는 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai) 건조분말 또는 이의 추출물을 이용한 동물의 사육방법에 관한 것으로, 본 발명의 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물은 항산화 효과를 가지고 있어 인간에게는 육질 개선, 이취 감소 및 각종 성인병 예방의 이익을, 가축에게는 소화력 증진, 사육 기간 단축, 사료비 절감 및 면역력 증대로 인한 각종 질병 예방의 이익을 주며, 또한, 음양곽의 유효성분인 이카린은 동물의 생식력 강화 및 자양강장의 기능을 부여하여 모체의 번식률을 높이는 효과를 발휘하므로 농가소득 증대에 기여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 본 발명을 참고예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0053] 단, 하기 참고예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예, 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1. 음양곽 건조분말의 제조

[0055] 대전시 중양시장에서 구입한 건조된 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai)의 잎 20 Kg을 분쇄기로 분쇄(1 mm 이하)하여 건조분말을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, "EKNDP" 라 명명함).

[0056] **실시예 2. 음양곽 추출물의 제조**

[0057] 대전시 중앙시장에서 구입한 음양곽(삼지구엽초; *Epimedium koreanum* Nakai)의 잎 50.2g을 약 2-3cm 길이로 절단하고, 80% 메탄올(methanol) 500ml을 가하여 20-25℃에서 1시간씩 3번 초음파세척기(Branson, B5510)로 추출하였다. 추출액을 증류기(evaporator, EYELA, SB-1000)를 이용하여 37℃에서 1.5시간동안 농축시킨 후, 24시간 동안 동결건조시켰다. 동결건조 후 건조 중량은 약 4.27g(수율: 8.5%)으로 수득하여, 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “EKNE” 라 명명함).

[0058] 상기 추출물(EKNE)을 주사용 증류수에 10 mg/ml로 용해시켜 oxy-radical의 소거능 평가에 사용하거나, 메탄올에 100 µg/ml로 용해시켜 이카린(icariin)분석에 사용하였다.

[0059] **참고예 1. 실험동물의 준비 및 사육조건**

[0060] 상기 실시예 1에서 수득한 음양곽 건조분말(EKNDP)을 시중에서 판매되는 사료(대상팜스코, 포커스 육성돈)에 5% 함량으로 섞은 후, 일일 150g 씩 2 주간 암.수를 섞어 5두를 배치한 7주령의 삼원교잡종[듀록(Duroc) × 랜드레이스(Landrace) × 라지화이트(Large white)]에 공급하였다. 돈방의 크기는 4 × 2.5 m였으며, 사료는 자유 채식토록하고, 물은 자동급수기를 이용하여 자유로이 먹을 수 있도록 하였다.

[0061] 음양곽 건조분말(EKNDP)이 포함된 사료를 2 주간 공급한 후 14시간 동안 절식시키고 다시 급여하기 전(0 시간)과 급여가 종료된 후 0.5, 1, 2 및 3 시간째에 채혈하여 혈청을 분리하고, 분석 시까지 -70도에서 보관하였으며, 채혈 후 다음날 음양곽 건조분말(EKNDP)이 포함된 사료를 급여하고 폐지를 도축하여 둔부조직을 채취하였다. 항산화 활성을 측정하기 위해 급여 종료 후 2 시간째의 혈청을 250배(v/v)로 주사용 증류수로 희석하여 사용하였으며 둔부 조직은 1.15% KCl 용액에 분쇄한 후 10,000g에서 원심분리하여 상등액을 사용하였다.

[0062] **참고예 2. 통계 분석**

[0063] 모든 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 통계적 유의성을 검증하기 위해 스튜던트 t 검정법(Student's t-test)을 수행하였다.

[0064] **실험예 1. 항산화 활성의 측정**

[0065] 음양곽 건조분말 또는 이의 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여 TOSC(Total Oxy-radical Scavenging Capacity) 분석법을 이용하여 하기와 같이 라디칼 소거능 실험을 실시하였다.

[0066] TOSC 분석(assay)은 윈스턴 등(Winston et al., *Free Radic. Biol. Med.*, Feb, 24(3), pp.480-493, 1998)에 의해 제안되고 같은 저자들에 의해 수정된 방법(Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Apr 15, 156(2), pp.96-105, 1999)을 이용하여 실시하였다. 퍼옥실 라디칼(Peroxyl radical)은 ABAP(2,2'-azobisamidinopropane)를 35℃에서 자유라디칼반응(thermal homolysis)시켜 발생시켰고(Winston et al., *Free Radic. Biol. Med.*, Feb, 24(3), pp.480-493, 1998), 하이드록실 라디칼(Hydroxyl radical)은 철(Fe)과 아스코르브산염(ascorbate)을 이용한 펜톤 반응(Fenton reaction; Winston and Cederbaum, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 9(2), pp.95-102, 1985)으로, 과산화질산염(peroxynitrite)은 SIN-1의 자발적인 붕괴(spontaneous decomposition)를 통해 발생시켰다. 발생한 각각의 활성 산소종(reactive oxygen species)은 KMBA(α-keto-γ-methiolbutyric acid)와 반응하여 에틸렌 가스(ethylene gas)를 발생하며 이 반응은 일정 범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로 보고된 바 있다(Winston et al., *Free Radic. Biol. Med.*, 24(3), pp.480-493, 1998; Regoli and Winston, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156(2), pp.96-105, 1999).

[0067] 반응은 최종 용량(volume) 1 ml의 반응액을 고무로 된 셉텀(rubber septum)으로 밀폐된 10 ml 용기에 넣어 진행시켰다. 에틸렌 가스(Ethylene gas) 생성 검출은 반응용기의 헤드 스페이스(head space) 내부 공기를 일정 용량(volume) 취하여 포로팩 N 컬럼(Poropack N column)과 FID(불꽃 이온화 검출기; flame ionization detector)를 장착한 GC(gas chromatography)로 분석하여 실시하였다. 상기 실험측정치로부터 구한 그래프를 적분(integration)하여 운동곡선화면적(AUC, area under the kinetic curve)을 얻었고, TOSC값은 하기 수학적 식 1을 통하여 산출하였다.

수학식 1

[0068] $TOSC = 100 - (\int SA / \int CA \times 100)$

[0069] $\int SA$ = 시료 반응의 곡선으로부터 적분한 범위

[0070] (integrated area from the curve of the sample reaction)

[0071] $\int CA$ = 대조군 반응의 곡선으로부터 적분한 범위

[0072] (integrated area from the curve of the control reaction)

[0073] 옥시라디칼 소거능(oxyradical scavenging capacity)을 전혀 갖지 못하는 시료의 경우에는 $\int SA / \int CA = 1$ 이 되며, $TOSC = 0$ 의 값을 갖는다. 반대로 $\int SA \rightarrow 0$ 일 때는, $TOSC$ 값은 100 에 접근한다. $TOSC$ 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

[0074] 에틸렌 가스(Ethylene gas)의 검출을 위해 포로팩 N 컬럼(Poropack N column)과 FID(불꽃 이온화 검출기; flame ionizing detector)를 장착한 GC(gas chromatography)를 오븐(oven) 60℃, 인젝터(injector) 180℃ 및 디텍터(detector) 180℃로 고정하고, 이동상으로는 헬륨을 30 ml/분의 속도로 컬럼으로 주입하였다. 바이알(Vial)의 에틸렌 가스(ethylene gas) 정량을 위해 헤드-스페이스 법(head-space technique)을 이용하여 바이알 안의 공기 150 μ l를 가스 밀폐된(gas-tight) 주사기로 취하여 인젝터(injector)에 주입하여 실험하였다. 항산화 활성은 음양곽 추출물의 건조중량(mg), 혈청의 부피(ml) 또는 조직의 무게(g)에 대한 $TOSC$ 값으로 나타내었다.

[0075] 실험결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 수득한 음양곽 추출물의 퍼옥실 라디칼 소거능 효과는 대표적인 체내 항산화 물질인 양성대조군 글루타치온의 $TOSC$ 값(940 ± 39 $TOSC/mg$)과 비교하여 약 3.3배의 효과를 보였으며, 하이드록실 라디칼 소거능 효과는 글루타치온의 $TOSC$ 값(257 ± 27 $TOSC/mg$)과 비교하여, 약 4.0배의 효과를 보였고, 과산화질산염 소거능 효과는 글루타치온의 $TOSC$ 값(347 ± 3 $TOSC/mg$)과 비교하여, 약 3.6배의 효과를 보임을 확인할 수 있었다. 이 결과는 음양곽 추출물이 강력한 항산화 효과가 있음을 시사한다.

표 1

[0076]

시 료	퍼옥실 라디칼 (Peroxyl Radical)	하이드록실 라디칼 (Hydroxyl Radical)	과산화질산염 (Peroxynitrite)
	(TOSC/mg)		
음양곽 추출물(EKNE)	3069 ± 137	1021 ± 213	1241 ± 152
양성대조군 글루타치온 (Glutathione)	940 ± 93	257 ± 27	347 ± 3

[0077] 또한, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 수득한 음양곽 건조분말을 첨가한 사료를 일일 150g 씩 2주간 섭취시키고 최종 급여 후 2 시간째의 돼지에서 얻은 혈청의 퍼옥실 라디칼, 하이드록실 라디칼 및 과산화질산염의 소거능은 정상적인 사료를 섭취한 돼지(대조군)와 비교하여 유의적인 차이를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 하기 표 3에 나타난 바와 같이, 음양곽 건조분말을 첨가한 사료를 섭취한 돼지의 둔부조직에서 측정된 oxy-radical 소거능 역시 1.2배 내외로 증가하였음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 음양곽 건조분말을 첨가한 사료의 급여가 효과적으로 돼지의 혈청 및 조직에서 oxy-radical에 대한 소거능을 증가시킴을 시사한다.

표 2

[0078]

시 료	퍼옥실 라디칼 (Peroxyl Radical)	하이드록실 라디칼 (Hydroxyl Radical)	과산화질산염 (Peroxynitrite)
	TOSC/ml 혈청(serum)		
대조군 (n=5)	5208±547	10821±1232	6021±332
음양곽 건조분말 섭취군(n=5)	8838±1888*	15312±241*	8213±215*
*대조군과의 유의성은 P<0.05으로 검정.			

표 3

[0079]

	퍼옥실 라디칼 (Peroxyl Radical)	하이드록실 라디칼 (Hydroxyl Radical)	과산화질산염 (Peroxynitrite)
	TOSC/g 조직		
대조군 (n=5)	10512±1025	6508±821	8521±813
음양곽 건조분말 섭취 군(n=5)	13214±1021*	8021±1421	10213±1021*
*대조군과의 유의성은 P<0.05으로 검정.			

[0080]

실험예 2. 이카린(icariin) 함량 분석

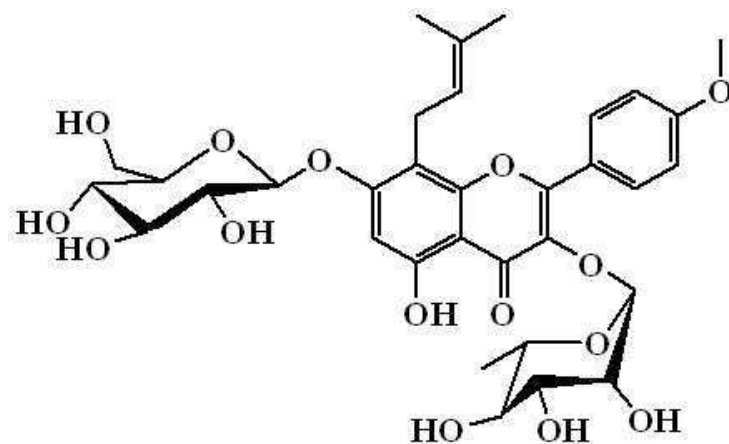
[0081]

음양곽 추출물, 음양곽 건조분말을 섭취한 돼지 혈청 및 조직의 icariin 함량을 분석하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

[0082]

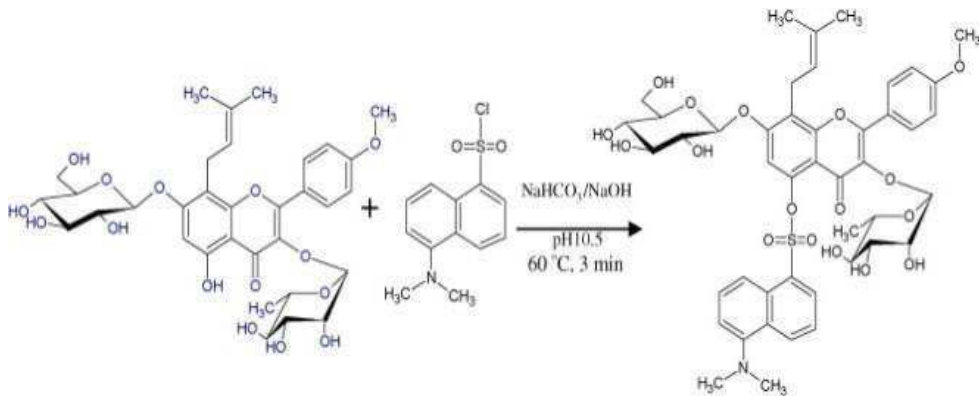
하기 화학식 1의 icariin을 충남대학교 약학대학 천연물연구실 김영호 교수로부터 분말형태로 공급받아, 정밀하게 칭량해서 100% DMSO로 용해하여 1 mg/mL 농도로 표준용액(stock solution)을 조제하였다. Dansyl-icariin은 pH 10.5의 염기성 조건에서 1mg/ml 농도의 dansyl-chloride를 동일 부피비로 가하고 60 ℃에서 3 분간 반응시키는 하기 반응식 1에서 묘사한 방법으로 합성하였다. Icariin과 dansyl-icariin의 용액을 각각 50% 아세토니트릴(acetonitrile)로 희석하여 0.1 µg/mL 농도로 조제하여 포지티브 이온화 모드(positive ionization mode)에서 API4000 LC-MS/MS system으로 분석법을 개발하였다.

화학식 1



[0083]

반응식 1



[0084]

[0085]

음양곽 추출물의 icariin 분석을 위하여 상기 실시예 2에서 수득한 동결건조물(EKNE)을 메탄올(methanol)에 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 용해시키고 분석기에 주입하여 정량하였다. 용해단계부터 세 번 반복하였다. 또한, 상기 참고예 1에서 준비한 돼지 혈청 및 조직의 icariin 성분을 측정하기 위해 시료를 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction 방법)으로 처리하고 dansyl-chloride를 이용하여 유도체화하였다. 추출은 100 μl 의 시료에 500 μl 의 n-헥산을 가하고 3 회 추출한 후, 다시 500 μl 의 에틸아세테이트(ethyl acetate)로 3 회 추출하였다. 층분리 후 유기층을 질소 조건에서 증발시켰다. 유도체는 pH 10.5의 염기성 조건에서 1mg/ml 농도의 dansyl-chloride를 동량 가하여 60 °C에서 3 분간 반응시키고 에틸아세테이트(ethyl acetate)로 추출하여 증발시킨 시료를 HPLC의 이동상에 녹여 분석하였다. 실험에 사용한 LC 및 MS조건은 하기 표 4에 정리하였다.

표 4

[0086]

LC	HPLC system	On-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler가 장착된 Agilent 1200 series
	컬럼(Column)	Waters XTerra MS C ₁₈ (2.1×50mm, 3.5 μm)
	이동상 (Mobile phase)	Linear gradient from 0.1% formic acid/2% acetonitrile/98% DI water to 0.1% formic acid/98% acetonitrile/2% DI water.
	유속 (Flow rate)	0.35 mL/min
MS	MS system	API4000 LC/MS/MS system
	이온원 (Ion source)	Turbo Ion Spray
	극성 (Polarity)	Positive
	MRM	Icariin: m/z 677>531 Dansyl-icariin: m/z 910>764 (Ret. Time: 3.38 min)

[0087]

음양곽 잎에서 icariin의 함량을 측정하기 위해 LC-MS/MS 조건을 확립하였다. 실험결과, 하기 도 1에 나타난 바와 같이, Icariin의 검출한계는 약 3.9 ng/ml이었으며, 동결건조물(EKNE) g 당 icariin의 함량은 34.1 mg으로 측정되었다. 음양곽 잎의 건조중량비가 8.5 %인 것을 고려할 때, 음양곽 잎 g 당 icariin의 함량은 2.9 mg/g으로 산출되었다.

[0088]

2 주간 음양곽 건조분말을 첨가한 사료를 공급한 돼지에서 급여 시점을 기준으로 0, 0.5, 1 및 3 시간째에 혈액을 취하고 혈청을 분리하여 icariin의 농도를 측정하였다. Icariin의 분석감도를 높이기 위해 icarrin을 dansyl chloride로 유도체화하고 LC-MS/MS로 분석방법을 확립하였다. 하기 도 2에 나타난 바와 같이, 확립된 분석 조건

에서 icarrin의 정상적인 검출한계는 46에서 137 pg/ml이었다.

[0089] 실험결과, 하기 표 5에 나타난 바와 같이, 음양곽 건조분말 첨가 사료의 급여 후 혈청에서 icariin 농도는 0.5, 1 및 3 시간째에 각각 1576.4, 2982.4 및 112.4 pg/ml로 측정되었으며, 0 시간(2 주간 음양곽 잎 첨가 사료 공급 후 저녁부터 절식시키고 아침에 새로 음양곽 잎을 공급하기 직전)에 미량이지만 5마리 실험동물 중에서 2 마리의 혈청에서 icariin이 검출되었음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 사료에 혼합되어 공급된 음양곽 건조분말이 효과적으로 위장관에서 흡수되어 혈액으로 이행하였음을 시사한다. 또한 미량이지만 급여 후 24시간째에도 혈청에 icariin이 남아 있음을 확인할 수 있었다.

[0090] 또한, 2 주간의 음양곽 건조분말 첨가 사료의 급여 후 도축된 돼지의 둔부조직에서 icariin의 농도가 243 pg/g 조직(tissue) 으로 측정되어, 혈액에서 조직으로 음양곽의 성분이 이행되었음을 확인할 수 있었다.

표 5

[0091]

시 료		Icariin 농도 (pg/ml 혈청)
	섭취 후 시간(hr)	
음양곽 건조분말 첨가 사료 섭취 후 혈청(n=5)	0	75.6±134.3
	0.5	1576.4±2003.7
	1	2982.4±3244.3
	3	112.4±138.8

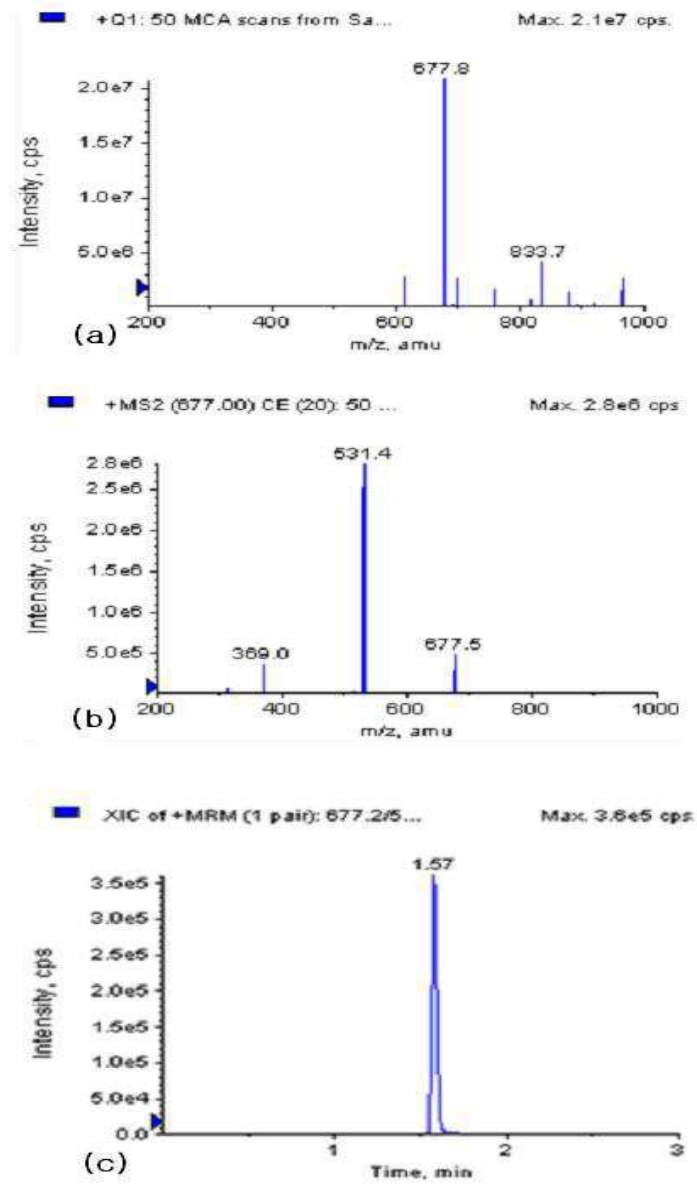
도면의 간단한 설명

[0092] 도 1은 이카린의 질량분광도 및 크로마토그램을 나타낸 도(a= 포지티브 이온화 모드에서 전체 Q1 분광도 (spectrum), b= Product ion 분광도, c= 크로마토그램(음양곽 추출물 100mg/L))이고,

[0093] 도 2는 dansyl-icariin의 질량분광도 및 크로마토그램을 나타낸 도(a= 포지티브 이온화 모드에서 전체 Q1 분광도 (spectrum), b= Product ion 분광도, c= 크로마토그램)이다.

도면

도면1



도면2

