

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0029494 (43) 공개일자 2013년03월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/22 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(21) 출원번호 10-2011-0092769		(72) 발명자 고성규 서울특별시 강남구 압구정로 201, 구 13동 104호 (압구정동, 현대아파트)
(22) 출원일자 2011년09월15일 심사청구일자 2012년09월13일		(74) 대리인 김순웅

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **옻나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 옻나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 NO 및 ROS의 생성을 억제하고, iNOS의 발현을 억제하여 뛰어난 항염증 효과를 나타내기 때문에, 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1

Extracts	Total phenolics	Total flavonoids	DPPH (EC ₅₀ , µg/ml)
Diethyl ether	21.56 ± 0.10	N/A	18.10 ± 0.05
Chloroform	13.18 ± 0.26	N/A	44.66 ± 0.12
Ethyl acetate	34.22 ± 0.05	1.89 ± 0.01	8.39 ± 0.09
n-butanol	20.81 ± 1.64	1.63 ± 0.04	16.07 ± 0.07
Water	5.10 ± 0.10	1.19 ± 0.01	>100

Each value is the mean ± SEM. EC₅₀ values were obtained and signify the concentration of sample necessary to scavenge 50% of DPPH radicals. Total phenolics; g/100 g of extract, dry weight. EC, effective concentration; N/A, not available.

특허청구의 범위

청구항 1

옻나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 에탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 분획물은 디에틸에터, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올 중 어느 하나를 이용한 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

옻나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 옻나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 염증(inflammation)은 몸을 구성하는 세포에 파괴를 주는 연속적이고 복합적인 반응이다. 염증 반응은 외부 감염원(박테이라, 곰팡이, 바이러스, 다양한 알레르기 유발물질)의 침입에 의해 형성되는 병리적 상태를 말하며, 이러한 생체의 세포나 조직에 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려고 하는 생체의 방어 반응과정이다. 이러한 방어 기작은 사이토카인, 혈장 효소계(plasma enzyme systems)(보체계, 응고인자, 키닌 등), 다른 세포들로부터 분비되는 지질 전달자(프로스타글라딘, 뉴코트리엔), 비만세포(mast cell), 백혈구(basophils), 혈소판(platelets)으로부터 증가되는 혈관 내에 조절자들의 작용에 의해 조절 된다(Ross A. et al., 2002). 대식세포는 선천성 면역(innate immunity)과, 후천성 면역(adaptive immunity)에 관여를 하며, 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질 등에 의하여 대식세포가 활성화 되

며, 화학적 자극에 의하여 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 질소산화물(nitric oxide, NO)를 생성하여 염증반응에서 중요한 역할을 한다. 특히 대식세포에서 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)나 인터페론- γ , 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)와 같은 사이토카인 자극에 의해 발현되는 유도성 질소산화물 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)는 장시간 동안 다량의 NO를 생산한다. 이러한 산화적 스트레스는 I κ B에 의하여 억제되어 있는 염증반응의 전사인자인 NF κ B 활성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 활성화된 NF κ B는 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2 및 인터루킨-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)나 TNF- α 와 같은 여러 종류의 사이토카인 등 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며, 이들 인자들을 저해하면 염증반응이 억제되는 것으로 알려져 있다(Baeuerle et al., Annu. Rev. Immunol.,12:141-179, 1994).

[0003] 정상적으로 외부 침입균에 의해 유도되는 염증반응은 생체를 보호하기 위한 방어 작용인 반면, 비정상적으로 과도한 염증반응이 유도되는 경우 다양한 질환들이 나타나게 된다. 이는 인체의 생명을 위협하는 질환으로서 급성염증, 류마티스 관절염과 같은 관절 내에서의 질환, 건선 등의 형태로 나타나는 피부질환 및 기관지 천식 등의 알러지성 염증 질환 등이 있다.

[0004] 이에 본 발명자들은 생체 내 부작용이 없어 장기간 사용할 수 있는 항염증제를 찾기 위하여, 천연 자원으로부터의 소재 개발연구를 계속한 결과, 옷나무 (*Rhus verniciflua* Stokes) 추출물 또는 이의 분획물이 iNOS 및 이를 조절하는 Akt 및 ERK 신호전달체계를 억제함으로써 뛰어난 항염증 효과를 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 옷나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 옷나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 옷나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 옷나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 조성물은 NO 및 ROS의 생성을 억제하고, iNOS의 발현을 억제하여 뛰어난 항염증 효과를 나타내기 때문에, 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 옷나무 추출물 또는 이의 분획물에 포함된 성분 및 DPPH 라디칼 소거 활성을 분석한 한 도표이다.

도 2는 옷나무 추출물 또는 이의 분획물의 세포 독성을 확인한 그림이다.

도 3은 옷나무 추출물 또는 이의 분획물이 아질산염 생성에 미치는 영향을 확인한 그림이다.

도 4는 옷나무 추출물 또는 이의 분획물이 ROS 생성에 미치는 영향을 확인한 그림이다.

도 5는 옷나무 부탄올 분획물이 iNOS 및 COX-2의 발현 조절에 미치는 영향을 면역 블랏을 통해 확인한

그림이다.

도 6은 옷나무 부탄을 분획물이 iNOS 및 COX-2의 발현 조절에 미치는 영향을 RT-PCR을 통해 확인한 그림이다.

도 7은 옷나무 부탄을 분획물이 Akt 및 ERK 신호전달에 미치는 영향을 확인한 그림이다.

도 8은 동물 모델에서 옷나무 부탄을 분획물의 항염증 효과를 확인한 도표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 이하 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [0012] 하나의 양태로서, 본 발명은 옷나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 (*Rhus verniciflua* Stokes, RVS)는 옷나무과에 속하는 낙엽활엽교목이다. 높이 12m, 지름 40cm까지 크며, 꽃은 자웅잡가(雌雄雜家)로서 5월에 연한 녹색 꽃이 피어 10월에 편구형(扁球形) 핵과가 결실한다. 바람을 막을 수 있는 동남향의 산록지·하안·밭둑 등이 적지이고, 표고 900m까지도 재배가 가능하다. 토심이 깊고, 돌이 섞인 석회토로서 비옥한 곳에서 잘 자란다. 옷나무는 수액을 채취하여 도료용으로 사용하는데, 옷칠 도료는 최고품으로 어떤 조건에서도 방부가 잘되고 변색이 되지 않아 넓게 사용하던 것이 최근에는 석유화학 도료에 밀려서 옷나무 재배가 소극적으로 이루어지고 있다. 옷칠을 내는 방법도 시기에 따라 초칠(初漆)·성칠(盛漆)·말칠(末漆)로 불려진다. 최근에는 머리 염색약도 옷칠로 만들고 있다. 옷나무에는 유독물질인 우루시올(Urushiol)이 있어 옷을 유발시킨다. 우루시올은 락크효소(Laccase)의 작용에 의하여 공기 중의 산소를 흡수하여 검은 수지 모양이 된다. 옷나무는 발아시키기가 조금 어려운데 가을에 익은 열매에 붙은 납을 제거하여야 하며 열매를 절구에 넣고 가볍게 짠 다음 다시 정미기에서 종피(種皮)를 얇게 갈아서 노천 매장하였다가 이듬해 봄에 파종한다.
- [0014] 본 발명의 옷나무 추출물 또는 이의 분획물은 하기와 같이 수득될 수 있다.
- [0015] 옷나무 (*Rhus verniciflua* Stokes, RVS)를 물로 세척하여 이물질을 제거한 후 그늘에서 건조하고 분쇄한다. 옷나무는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 분쇄된 옷나무에 적당한 양의 용매를 첨가하여 완전히 침지되도록 한다. 추출용매로는 물, 탄소수 1내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매가 바람직하며, 보다 바람직하게는 에탄올이다. 다음 상기에서 얻은 옷나무의 추출물을 여과한 후 감압 농축하여 최종 추출물을 수득한다. 또한, 옷나무 분획물은 상기 과정을 통해 수득된 추출물을 증류수에 녹이고, 디에틸에터(diethyl ether), 클로로포름(CHCl_3), 에틸아세테이트(EtOAc), n-부탄올(BuOH)을 이용하여 순차적으로 분획물을 수득한다.
- [0016] 본 발명의 조성물은 옷나무 추출물 또는 이의 분획물과 함께 염증성 질환의 예방 및 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0019] 본 발명에서의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 옷나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0020] 본 발명에서의 용어, "치료"는 본 발명에 따른 옷나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0021] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing

Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 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), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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, 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 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 약학적 조성물의 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 조성물은 1일 0.0001 내지 10000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 1000 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 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, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0024] 또 다른 양태로써, 본 발명은 옷나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0025] 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0026] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0027] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 0.4 g, 바람직하게는 약 0.02 내지 0.03 g 이다.

[0028] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0029] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0030] **실시예 1: 쯔나무 추출물 및 분획물의 제조**

[0031] 쯔나무 (*Rhus verniciflua* Stokes, RVS)를 건조 및 분쇄시킨 후, 80% 에탄올에서 30분간 2회 Sonication하여 추출한 후, 필터 후 진공 증발기 (vacuum evaporator)로 건조시켰다. 수득된 추출물을 증류수에 녹이고, 디에틸 에터 (diethyl ether), 클로로포름 (CHCl_3), 에틸아세테이트 (EtOAc), n-부탄올 (BuOH)을 이용하여 순차적으로 분획물을 수득하였다. 수득된 추출물 및 분획물의 수율은 디에틸에터 층 2.46%, CHCl_3 층 35%, EtOAc 층 0.81%, BuOH 층 1.62%, 물층 0.53%로 나타났다.

[0032] 상기 과정을 통해 수득된 분획물에 포함된 총 페놀 (total phenolics), 플라보노이드(flavonoids) 및 DPPH 라디칼 소거 활성 (radical scavenging activity)을 분석하였다. 실험 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 총 페놀 및 플라보노이드는 에틸아세테이트 층에서 가장 높게 나타났으며, 다음으로 부탄올층이 높게 나타났다. 또한, DPPH 라디칼 소거 활성 실험 결과 에틸아세테이트, 부탄올, 디에틸에터, 클로로포름 층 순으로 나타났으며, 이를 통해 라디칼 소거 활성은 총 페놀에 관련된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0033]

[0034] **실시예 2: 쯔나무 추출물이 세포 생존에 미치는 영향 분석**

[0035] MTT assay를 통해 쯔나무 추출물이 세포 생존에 미치는 영향을 분석하였다.

[0036] 실험결과, 도 2에 나타난 바와 같이, $20 \mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 모든 분획물 층에서 세포 독성은 나타나지 않았다. 그러나 $20 \mu\text{g/ml}$ 의 농도를 초과하자, 에터 및 클로로포름 층에서 세포 생존이 감소하였다. 이러한 실험 결과를 토대로 이후 실험에서는 각 분획물은 $20 \mu\text{g/ml}$ 의 농도를 이용하였다.

[0037] **실시예 3. 쯔나무 추출물이 NO 및 ROS 생성에 미치는 영향 분석**

[0038] 쯔나무 추출물의 면역 억제 효능을 확인하기 위하여, 아질산염 어쎄이 (nitrite assay)를 통해 NO (Nitric oxide)의 생성을 분석하였으며, 아질산염의 농도는 Griess 반응을 통하여 분석하였다. 또한, ROS의 생성은 DCHF-DA를 이용하여 측정하였다. DCHF-DA는 자유롭게 세포 내외를 이동할 수 있으며, 산화적 물질에 의하여 DCF(2,7-dichlorofluorescein)로 전환되어 발생하는 형광정도를 측정한다. 따라서 DCHF-DA는 세포 내 산화 활성 물질의 생성을 나타내고, 인접한 세포에서 산화적 손상을 확인하는 방법으로 널리 쓰이는 물질이다.

[0039] 실험 결과, 도 3 및 도4에 나타난 바와 같이, LPS에 의해 유발된 대식세포에서 쯔나무 추출물이 NO 및 ROS생성 억제 효과를 나타냄을 확인하였다. 특히 부탄올 분획물이 가장 뛰어난 억제 효능을 나타내었다.

[0040] **실시예 4. 쯔나무 추출물이 iNOS 발현 억제에 미치는 영향 분석**

[0041] 실시예 3에서 부탄올 분획물이 NO 및 ROS 생성 억제에 가장 효과적임을 확인하였기에, 쯔나무 부탄올 분획물을 이용하여 면역반응에 관여하는 iNOS 및 COX-2 발현 억제에 관여하는지 확인하였다.

[0042] 실험 결과, 도 5 및 도6에 나타난 바와 같이, 쯔나무 부탄올 분획물을 24시간동안 처리한 결과 면역블롯 (immune blot, 도 5)과 RT-PCR (도 6) 모두에서 현저한 iNOS 발현 감소가 나타났다. 또한 COX-2 역시 쯔나무 부탄올 분획물의 처리에 의하여 유의한 발현 감소를 나타내었다.

[0043] **실시예 5. 쯔나무 추출물이 Akt 및 MAPKs 신호전달에 미치는 영향 분석**

[0044] LPS로 유도된 대식세포 RAW 264.7 세포에 쯔나무 부탄올 분획물을 처리하여 맛의 인산화를 면역 블랏을 통해 관

찰하였다.

[0045] 실험결과 도 7에 나타낸 바와 같이, 윗나무 부탄을 분획물을 2시간 동안 처리하였을 때 전체 Akt 의 발현량은 변화가 없었으나, 인산화된 Akt 의 발현은 감소하였다. 또한, 본원 발명의 조성물이 MAPKs 신호전달을 조절하는 지를 확인하기 위하여, p38, ERK2, JNK1의 인산화를 확인한 결과, 윗나무 부탄을 분획물은 ERK2의 인산화를 감소시켰으나, p38 및 JNK1의 활성화에는 영향이 없는 것으로 나타났다.

[0046] 실시예 6. 동물실험

[0047] 윗나무 추출물의 항면역효과를 동물 모델을 이용하여 확인하였다.

[0048] ICR (Imprinting control region) 마우스를 이용하였으며, $20 \pm 2^{\circ}$ C의 온도, 40~60%의 습도, 12시간 낮/밤 사이클 속에서 유지하였다. 항면역효과를 확인하기 위하여 Carrageenan-induced 마우스 발 부종 (paw edema) 모델을 이용하였다. 알려진 방법에 따라 마우스 모델을 제조하였으며, 물질의 처리 전에 두께 게이지 (dial thickness gauge)를 이용하여 각 마우스의 오른쪽 발의 평균적인 부피 (V_o)를 측정하였다. 대조군과 실험군으로 나누어 식염수 또는 윗나무 부탄을 분획물 (100mg/kg b.w.)를 경구투여하였다. 투여 1시간 후, 1% 카라기닌 (carrageenan) 50 μ g을 오른쪽 뒷 발에 주입하여 발 부종을 유발하였다. 주입 5시간 후에 발 볼륨을 측정 (V_t) 하였으며, plethysmometer를 이용하여 부종의 크기를 측정하였다.

[0049] 실험 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 윗나무 부탄을 분획물을 투여한 군에서 대조군에 비해 현저한 발 부종의 감소가 나타났으며, 이를 통해 윗나무 추출물의 항염증 효과를 확인할 수 있었다.

[0050] 이하 본 발명의 상기 조성물을 함유하는 구강용 조성물 및 약학적 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0051] 제제예 1 : 약학적 제제의 제조

[0052] 1. 산제의 제조

[0053] 윗나무 추출물 또는 이의 분획물 2g

[0054] 유당 1g

[0055] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0056] 2. 정제의 제조

[0057] 윗나무 추출물 또는 이의 분획물 100mg

[0058] 옥수수전분 100mg

[0059] 유당 100mg

[0060] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0061] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0062] 3. 캡슐제의 제조

[0063] 윗나무 추출물 또는 이의 분획물 100mg

[0064] 옥수수전분 100mg

[0065] 유당 100mg

[0066] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0067] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0068] **제제예 2 ; 식품의 제조**

[0069] 1. 건강기능식품의 제조

[0070] 옷나무 추출물 또는 이의 분획물 100 mg

[0071] 비타민 혼합물 적량

[0072] 비타민 A 아세테이트 70 μ g

[0073] 비타민 E 1.0 mg

[0074] 비타민 B1 0.13 mg

[0075] 비타민 B2 0.15 mg

[0076] 비타민 B6 0.5 mg

[0077] 비타민 B12 0.2 μ g

[0078] 비타민 C 10 mg

[0079] 비오틴 10 μ g

[0080] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0081] 엽산 50 μ g

[0082] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0083] 무기질 혼합물 적량

[0084] 황산제1철 1.75 mg

[0085] 산화아연 0.82 mg

[0086] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0087] 제1인산칼륨 15 mg

[0088] 제2인산칼슘 55 mg

[0089] 구연산칼륨 90 mg

[0090] 탄산칼슘 100 mg

[0091] 염화마그네슘 24.8 mg

[0092] 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.

[0093] 2. 건강음료의 제조

[0094] 옷나무 추출물 또는 이의 분획물 100 mg

[0095] 비타민 C 15 g

[0096] 비타민 E(분말) 100 g

[0097] 젯산철 19.75 g

[0098] 산화아연 3.5 g

- [0099] 니코틴산아미드 3.5 g
- [0100] 비타민 A 0.2 g
- [0101] 비타민 B1 0.25 g
- [0102] 비타민 B2 0.3g
- [0103] 물 정량
- [0104] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
- [0105] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

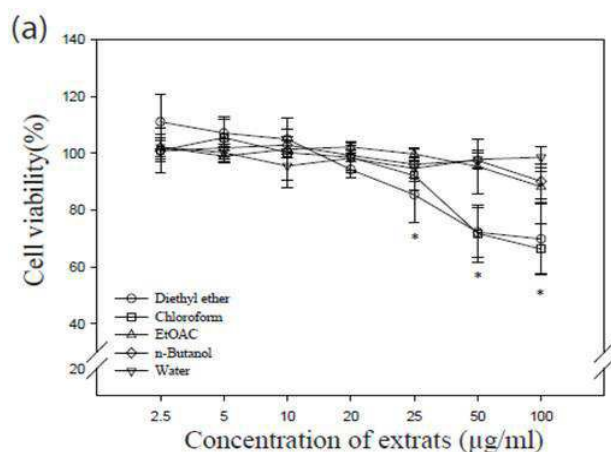
도면

도면1

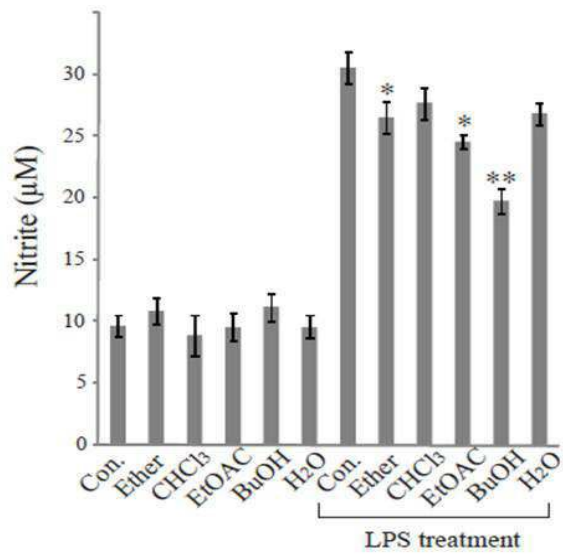
Extracts	Total phenolics	Total flavonoids	DPPH (EC ₅₀ , µg/ml)
Diethyl ether	21.56 ± 0.10	N/A	18.10 ± 0.05
Chloroform	13.18 ± 0.26	N/A	44.66 ± 0.12
Ethyl acetate	34.22 ± 0.05	1.89 ± 0.01	8.39 ± 0.09
n-butanol	20.81 ± 1.64	1.63 ± 0.04	16.07 ± 0.07
Water	5.10 ± 0.10	1.19 ± 0.01	>100

Each value is the mean ± SEM. EC₅₀ values were obtained and signify the concentration of sample necessary to scavenge 50% of DPPH radicals. Total phenolics; g/100 g of extract, dry weight. EC, effective concentration; N/A, not available.

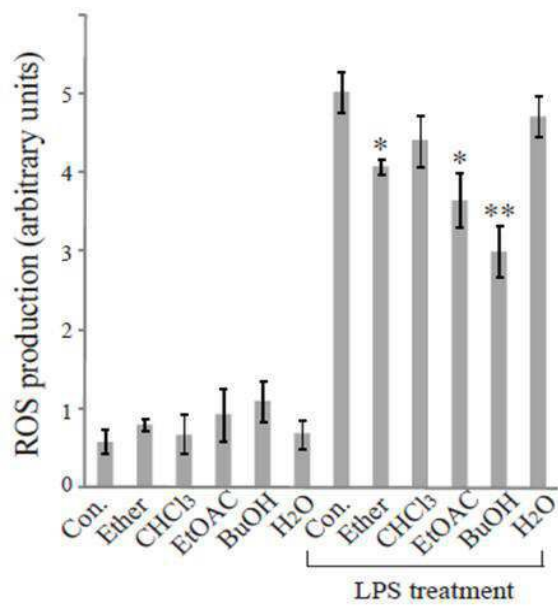
도면2



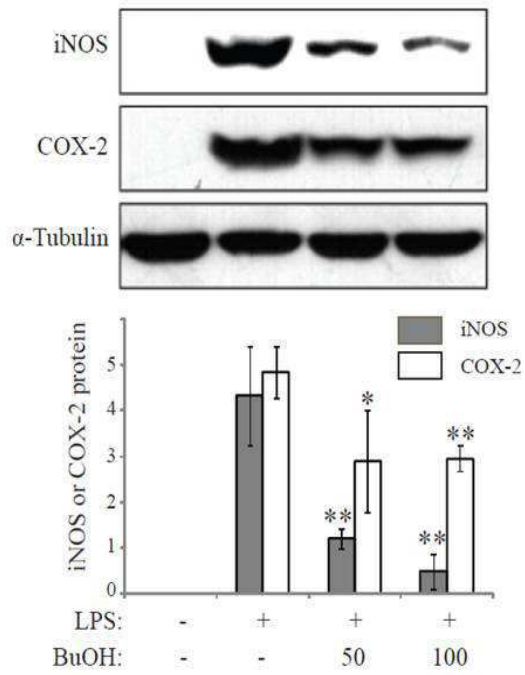
도면3



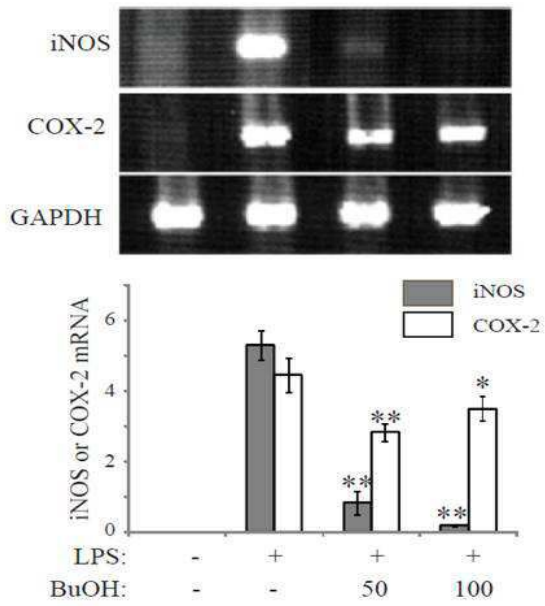
도면4



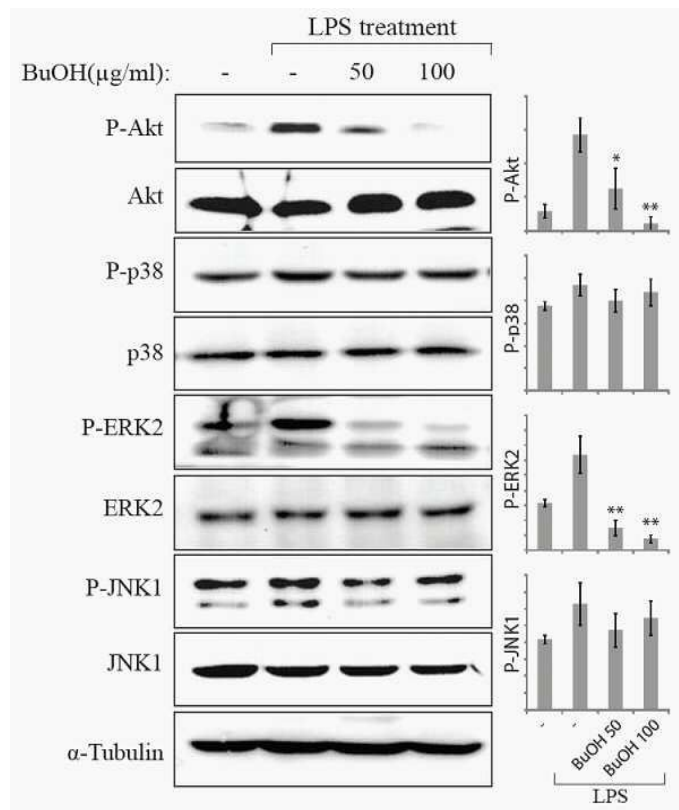
도면5



도면6



도면7



도면8

Treatment	Increased paw volume (%)					
	1 h	2 h	4 h	5 h	6 h	24 h
Control (n=6)	71.9 ± 23.9	57.6 ± 18.6	54.1 ± 15.5	51.2 ± 13.1	49.7 ± 13.7	50.3 ± 11.3
BuOH (n=7)	63.1 ± 7.4	46.9 ± 10.7	39.7 ± 8.0	36.3 ± 9.7*	35.7 ± 10.4	35.5 ± 11.6*

The amount of BuOH used in this study was 100 mg/kg. Values represent mean ± SD. *P < 0.05 is compared with control group.