



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월22일

(11) 등록번호 10-1514284

(24) 등록일자 2015년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/25 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0099733

(22) 출원일자 2013년08월22일

심사청구일자 2013년08월22일

(65) 공개번호 10-2015-0022219

(43) 공개일자 2015년03월04일

(56) 선행기술조사문헌

J. Chem. Soc. Pak., Vol.34, No.2,
pp.419-423(2012.04.)*

- 한국작물학회 학술발표대회논문집, Vol.51,
No.1, pp.630-631(2006.04.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

강원대학교산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자

김명조

강원 춘천시 후만로 119, 3동 106호 (후평동, 금
호빌리지)

권용수

강원도 춘천시 퇴계로 220-19 302동 506호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 3 항

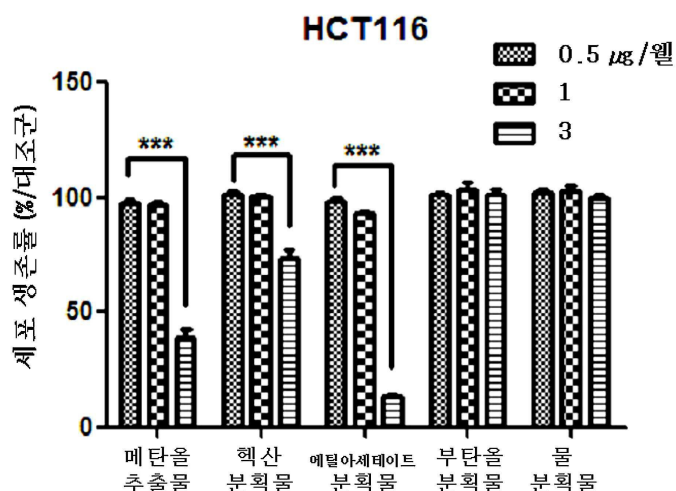
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 **맛두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 맛두릅나무(*Oplopanax elatus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 맛두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 다양한 암세포주에 대하여 유의적인 세포독성 효과, 치사 효과(lethal effect) 및 세포사멸(apoptosis) 효과를 나타내며, 여드름 균에 대한 항균 효과를 나타내므로, 암 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이예지

경기 여주시 세종로517번길 7-20, 1112호 (점봉동,
인창아파트)

유창연

강원 춘천시 퇴계로 220-20, 306동 301호 (석사동,
현대3차아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

땃두릅나무(*Oplopanax elatus*) 줄기 및 가지의 메탄올 추출물 또는 이의 에틸 아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 대장암, 폐암, 간암, 위암, 췌장암, 담도암, 유방암, 자궁경부암 및 전립선암으로 구성된 군으로부터 선택되는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 에틸 아세테이트 분획물은 땃두릅나무 줄기 및 가지의 메탄올 추출물로부터 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol) 또는 물로 순차적으로 분획하여 얻은 에틸 아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 대장암, 폐암, 간암, 위암, 췌장암, 담도암, 유방암, 자궁경부암 및 전립선암으로 구성된 군으로부터 선택되는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

땃두릅나무 줄기 및 가지의 메탄올 추출물 또는 이의 에틸 아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 대장암, 폐암, 간암, 위암, 췌장암, 담도암, 유방암, 자궁경부암 및 전립선암으로 구성된 군으로부터 선택되는 암 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 땃두릅나무(*Oplopanax elatus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 최근 웰니스(wellness)라는 단어가 유행하고 있다. 웰빙과 행복 또는 웰빙과 건강(fitness)의 합성어인 이 단어는 신체 및 정신, 사회적으로 건강한 상태를 의미한다. 이처럼 건강을 유지하면서 삶의 질을 높이기 위한 노력이 큰 관심을 받고 있으며 우리나라 사람의 평균 수명이 80세에 근접함에 따라 건강과 관련된 의약품, 식품, 화장품 등의 관심과 수요, 공급이 급증하고 있는 실정이다. 이러한 원천을 천연의 자생 식물자원으로부터 얻으려는 노력이 점차 고조되고 있다.
- [0003] 이에 따라 전해져 오는 민간요법이나 동의보감, 본초강목 등의 의서들을 바탕으로 한방에서 사용되는 약제들에 대한 성분 분석 및 식물자원의 활성을 과학적인 실험으로 규명하려는 연구가 활발히 진행 중이다.
- [0004] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포주가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고 비조절적인 방식으로 증식하고 불사화 되어 발생하는 질병이다. 암 발생의 원인으로는 화학물질, 바이러스, 세균, 전리 방사선 등의 환경적 또는 외적 요인과 선천성 유전자 변이 등의 내적 요인을 들 수 있다(Klaunig & Kamendulis, Annu Rev Pharmacol Toxicol., (2004)44:239-267).
- [0005] 초기에 발견된 암일 경우 수술, 방사선 치료, 화학적 요법 등의 치료법이 있으나 그 부작용 또한 큰 문제로 대두하고 있으며, 말기 암이나 전이된 암의 경우 특별한 치료법 없이 시한부 인생으로 삶을 마감하는 상황이다. 또한, 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되고 그에 따른 치료제가 개발되어 오고 있으나, 아직까지 암에 대한 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다.
- [0006] 땃두릅나무(*Oplopanax elatus*)는 두릅나무과에 속하는 낙엽활엽 관목으로 깊은 산의 숲속에서 자라며 전 세계적으로 우리나라, 러시아, 중국, 미국, 캐나다 등 소량 분포하는 것으로 알려져 있다. 땃두릅나무는 미국 및 캐나다에서 자생하는 오팔로파낙스 호리더스(*Oplopanax elatus*), 일본의 *O. 자포니쿠스(O. japonicus)* 및, 한국, 중국 및 러시아 지역에 자생하는 *O. 엘라투스(O. elatus)*의 3종이 서식하고 있다. 국내에는 소량 자생하고 있어 멸종 위기종으로 보호수로 지정되어 있다.
- [0007] 땃두릅나무의 생약명은 자인삼(혹은 천삼)이라 하여 인삼과 비슷한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 땃두릅나무는 한방에서 주로 기를 돕고, 심혈관질환 및 당뇨병 등을 치료하고 중추신경을 흥분시키는 작용을 하여 신경쇠약, 저혈압 및 정신분열증 등에 효과적인 것으로 보고된 바 있으며(Zhang et al, 1993), 휘발성 오일은 경련길항작용, 항노화 작용, 항염증 작용 및 항균 작용 등에 효능이 있다고 알려져 있다(장백산식물약지, 1982). 주로 건조된 뿌리와 줄기 부분을 사용하고 이 부분에 다량의 사포닌, 휘발성 오일, 플라보논, 안트라퀴논 및 지방산 등의 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근 일에도 많은 유효성분이 함유되어 있다는 보고가 있었으며, 이는 뿌리 및 줄기의 성분과 큰 차이가 없는 것으로 알려져 있다(Wang et al., 2004). 그러나, 땃두릅나무의 항암 활성에 대하여는 보고된 바가 없다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 한방 약제로 사용되는 천연물 유래의 암 예방 및 치료제를 개발하기 위해 노력한 결과, 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 다양한 암세포주에 대하여 세포독성 효과, 치사 효과(lethal effect) 및 세포사멸(apoptosis) 효과를 나타내며, 여드름 균에 대한 항균 효과를 나타내므로, 상기 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 암 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분에 효과적으로 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 땃두릅나무(*Oplopanax elatus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 땃두릅나무(*Oplopanax elatus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0012] 아울러, 본 발명은 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명의 땃두릅나무(*Oplopanax elatus*) 추출물 또는 이의 분획물은 다양한 암세포주에 대하여 유의적인 세포독성 효과, 치사 효과(lethal effect) 및 세포사멸(apoptosis) 효과를 나타내며, 여드름 군에 대한 항균 효과를 나타내므로, 상기 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 암 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 대장암세포주 HCT116에 대한 추출 용매에 따른 땃두릅나무(*Oplopanax elatus*) 추출물 및 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 2는 대장암세포주 HT29에 대한 추출 용매에 따른 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 3은 정상 신장세포주 293에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 4는 대장암세포주 HCT116에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 5는 대장암세포주 SW480에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 6은 대장암세포주 WiDr에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 7은 대장암세포주 LoVo에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 8은 대장암세포주 HT29에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 9는 폐암세포주 A549에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 10은 폐암세포주 NCI-H358에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 11은 간암세포주 Hep-G2에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 12는 간암세포주 LX-2에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 13은 위암세포주 AGS에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.
- 도 14는 담도암세포주 HUCCT-1에 대한 땃두릅나무 메탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.

도 15는 채장암세포주 Choi-ck에 대한 땃두릅나무 메탄을 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.

도 16은 유방암세포주 MCF-7에 대한 땃두릅나무 메탄을 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.

도 17은 유방암세포주 MDA-MD-231에 대한 땃두릅나무 메탄을 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.

도 18은 자궁경부암세포주 HeLa에 대한 땃두릅나무 메탄을 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.

도 19는 전립선암세포주 PC-3에 대한 땃두릅나무 메탄을 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과의 확인을 나타내는 도이다.

도 20은 땃두릅나무 분획물의 암세포에 대한 치사 효과(lethal effect)의 확인을 위한 집락형성분석을 나타내는 도이다.

도 21은 땃두릅나무 분획물의 암세포에 대한 치사 효과의 확인을 나타내는 도이다.

도 22는 땃두릅나무 분획물의 세포사멸(apoptosis) 효과 확인을 확인하기 위한 유세포 분석(flow cytometry analysis)을 나타내는 도이다.

도 23은 땃두릅나무 분획물의 세포사멸 효과를 확인을 확인하기 위한 도이다.

도 24는 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*; KCTC 3314)에 대한 땃두릅나무 분획물의 항균 활성을 나타내는 도이다.

도 25는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*; KCTC 1916)에 대한 땃두릅나무 분획물의 항균 활성을 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 땃두릅나무(*Oplonanax elatus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은

1) 땃두릅나무에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

3) 상기 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하는 단계;

4) 상기 단계 3)의 추출물을 순차적으로 유기용매로 추출하여 분획물을 제조하는 단계를 포함하는 제조방법에 의하여 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 땃두릅나무는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있고, 잎, 줄기, 가지 또는 뿌리가 모두 이용가능하며, 줄구체적으로 뿌리, 줄기 및 가지가 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출용매는 건조된 땃두릅나무 중량의 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 구체적으로 2.5 배 첨가하는 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출을 위한 방법으로 진탕추출, Soxhlet 추출, 환류추출, 초임계 추출, 아임계 추출, 고온 추출, 고압 추출, 또는 초음파 추출법과 같은 추출장치를 이용한 방법 또는 XAD 및 HP-20을 포함한 흡착 수지를 이용하는 방법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있으며, 구체적으로 추출장치를 이용한

방법이 보다 바람직하고, 더욱 구체적으로 환류 추출하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0025] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 상기 분획물은 추출물로부터 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol) 또는 물로 순차적으로 분획하여 얻은 헥산 분획물, 에틸 아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 상기 암은 대장암, 폐암, 간암, 위암, 췌장암, 담도암, 유방암, 자궁경부암 및 전립선으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 땃두릅나무 추출물을 제조하였고, 상기 추출물을 헥산(hexane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol) 또는 물로 순차적으로 분획하여 헥산 분획물, 에틸 아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 또는 물 분획물을 제조하였다.
- [0030] 또한, 본 발명자들은 대장암 및 다양한 암 세포주에서 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물의 세포독성 효과를 확인한 결과, 에틸 아세테이트 분획물이 가장 낮은 IC₅₀ 값을 나타내어 유의적인 세포독성 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 1 내지 19 및 표 1 참조).
- [0031] 또한, 본 발명자들은 땃두릅나무의 에틸 아세테이트 분획물이 암 세포주에 대하여 나타내는 치사 효과(lethal effect) 및 세포사멸(apoptosis) 효과를 확인한 결과, 상기 분획물의 농도에 의존적으로 세포 집락의 형성이 억제되어 유의적인 치사 효과를 나타내며(도 20 및 21 참조), 세포 생존률이 감소하여 효과적인 세포 사멸이 유도되는 것을 확인하였다(도 22 및 23 참조).
- [0032] 따라서, 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 다양한 암세포주에 대하여 유의적인 세포독성 효과, 치사 효과(lethal effect) 및 세포사멸(apoptosis) 효과를 나타내므로, 상기 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 암 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0034] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0035] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용 또는 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 피부외용으로 사용한다.

- [0037] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준 은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발 명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또 는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최 소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환 의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물의 양을 기준으로 0.01 내지 1000 mg/kg이고, 바람직하게는 30 내지 500 mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50 내지 300 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사 용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 다양한 암세포주에 대하여 유의적인 세포독성 효과, 치사 효 과(lethal effect) 및 세포사멸(apoptosis) 효과를 나타내므로, 상기 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 암 예방 및 개선용 건강식품의 유효성분에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0042] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시 지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0043] 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중 량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때 문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성 분에는 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, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스 파르탐 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.
- [0045] 상기 외에 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍 미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 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 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분

획물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

- [0046] 또한, 본 발명은 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 향균용 조성물을 제공한다.
- [0047] 상기 조성물은 여드름을 유발하는 것으로 알려진 당업계의 통상적인 여드름 균에 대해 항균활성을 나타내는 것이 바람직하며, 구체적으로는 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 또는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대해 항균활성을 나타내는 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 여드름균인 프로피오니박테리움 아크네스 또는 스태필로코커스 아우레우스를 배양하여 종이 디스크 방법(paper disc method)를 통해 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물의 항균 효과를 확인한 결과, 땃두릅나무 에틸 아세테이트 분획물의 농도 의존적으로 효과적인 항균 활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 2, 도 24 및 도 25 참조).
- [0049] 따라서, 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 여드름균에 대하여 효과적인 항균 활성을 나타내므로, 상기 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 향균용 조성물의 유효성분에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명은 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0051] 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 다양한 암세포주에 대하여 유의적인 세포독성 효과, 치사 효과(lethal effect) 및 세포사멸(apoptosis) 효과를 나타내므로, 상기 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물은 암 예방 및 개선용 건강식품의 유효성분에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0052] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.
- [0053] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0054] **<실시예 1> 땃두릅나무(*Oplopanax elatus*) 추출물의 제조**
- [0055] 땃두릅나무는 강원심마니영농조합법인에서 입수하여 강원대학교 농업생명과학대학 식물자원응용공학과와 약용식물 분류 전문가의 감정을 받아 확인하였으며, 표준품을 보관하였다. 상기 땃두릅나무를 건조하여 줄기 및 가지 1.67 kg에 80% 메탄올을 첨가하여 환류냉각기(reflux condenser)로 추출한 후, 감압 여과한 뒤 농축하여 메탄올 추출물을 수득하였으며, 상기 방법을 3 회 반복하여 땃두릅나무의 80% 메탄올 추출물 99.6 g을 수득하였다.
- [0056] **<실시예 2> 땃두릅나무 분획물의 제조**
- [0057] 건조한 땃두릅나무의 줄기 및 가지에 80% 메탄올을 첨가하여 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 제조한 땃두릅나무 추출물 97.3571 g을 증류수 1 ℓ에 현탁한 후, 노르말-헥산(n-hexane) 1 ℓ를 가하고 흔들어 수득한 노르말-헥산 가용성 분획을 감압 농축하였다. 그런 다음, 남은 물층에 에틸 아세테이트(ethyl acetate; EA) 1 ℓ를 가하고 흔들어 에틸 아세테이트 분획물을 수득하여 감압 농축하고, 다시 남은 물층에 노르말-부탄올(n-butanol)을 가하여 동일한 상기와 동일한 방법을 수행하여 노르말-부탄올 분획물을 수득하였다.
- [0058] 그 결과, 노르말-헥산 분획물 28.4 g, 에틸 아세테이트 분획물 17.7 g, 노르말-부탄올 분획물 9.3 g 및 수층 분획물 34 g을 수득하였다.
- [0059] **<실험예 1> 추출 용매에 따른 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물의 세포독성 효과의 확인**

[0060] <1-1> 암세포 배양

[0061] 본 발명의 실험예를 수행하기 위해 다양한 암세포주를 배양하였다.

[0062] 구체적으로, 한국 세포주 은행(Korean Cell line Bank; KCLB)에서 다양한 인간 암세포주를 구입하였다. 정상 신장세포주인 293 및 자궁경부암주인 HeLa는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 100 U/ml 페니실린 G(penicillin G) 및 50 µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 DMEM(Hyclone 사, 미국) 배지에서 배양하였다. 또한, 인간 대장암세포주인 HCT116, SW480, WiDr, LoVo 및 HT29, 폐암세포주인 A549 및 NCI-H358, 간암세포주인 HepG2 및 LX-2, 위암세포주인 AGS, 췌장암세포주인 CHoi-CK, 담도암세포주인 HuCCT-1, 유방암세포주인 MCF-7 및 MDA-MD-231 및 전립선암세포주인 PC-3는 10% FBS, 100 U/ml 페니실린 G(penicillin G) 및 50 µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함하는 RPMI-1640(Hyclone 사, 미국) 배지에서 배양하였다. 상기 DMEM 및 RPMI-1640 배지에 접종한 세포는 5 % 이산화탄소를 유지하는 37℃ 항온 배양기에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 5 분간 트립신-EDTA(trypsin-EDTA)를 처리하여 계대배양하였다.

[0063] <1-2> 추출 용매에 따른 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물의 대장암 세포주에 대한 세포독성 효과의 확인

[0064] 유의적인 항암 활성을 가지는 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 선별하기 위하여, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; MTT) 분석(Ishiyama M *et. al*, Biol Pharm Bull 19: 1518-1520, 2006)을 수행하여 추출 용매에 따른 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물의 세포독성 효과를 대장암 세포주에서 확인하였다.

[0065] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>에서 배양한 인간 대장암세포주인 HCT116을 96 웰 플레이트에 웰 당 5×10^3 세포의 농도로 50 µl 씩 분주한 후 37℃의 5% 이산화탄소 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, HCT116 세포 및 HT29 세포에 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>에서 제조한 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 0.5, 1 및 3 µg/웰의 농도로 희석하여 웰 당 50 µl씩 첨가하여 다시 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지 및 추출물을 제거한 다음, 1 mg/ml의 MTT 시약을 100 µl씩 분주하고, 37℃의 5% 이산화탄소 배양기에서 4 시간 동안 방치하여 반응하였다. 반응 후에는 반응액을 제거하고 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO) 50 µl를 가하여 상온에서 발색하였고, ELISA 마이크로플레이트 리더(ELISA microplate reader; 모델명 680, Bio-RAD 사, Japan)에서 흡광도를 측정한 다음, 하기 [수학식 1]을 사용하여 암세포 증식 억제율을 계산하여 암세포에 대한 세포독성 효과를 확인하였다. 대조군으로는 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 첨가하지 않고 HCT116 세포 및 HT29 세포를 배양한 다음 상기 과정과 동일한 방법으로 MTT 분석을 수행하였다.

수학식 1

[0066]
$$\text{생존률(\%)} = \frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

[0067] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 50%의 세포에 대하여 독성을 나타내는 농도인 IC₅₀ 값에서 에틸 아세테이트 분획물이 HCT116에 대하여 2.42 µg/웰을 나타내며 5µg/웰의 농도로 첨가하였을 때 암세포주가 급격하게 사멸되는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2). 또한, HT29에 대한 IC₅₀은 3.14 µg/웰을 나타내어, 땃두릅나무 추출물 및 노르말-핵산 분획물의 IC₅₀ 값보다 효과적인 것을 확인하였다(도 1 및 도 2).

[0068] <1-3> 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물의 암세포주에 대한 세포독성 효과의 확인

[0069] 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물의 암세포주에 대한 세포독성 효과를 확인하기 위하여, 다양한 암세포주에 대한 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과를 확인하였다.

[0070] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>에서 배양한 다양한 암세포주에 대하여, 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과를 상기 실험예 <1-2>와 동일한 방법을 수행하여 확인하였다. 대조군으로는 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 첨가하지 않고 다양한 암세포주를 배양한 다음 상기 과정과 동일

한 방법으로 MTT 분석을 수행하였다.

그 결과, 도 3 내지 20 및 하기 [표 1]에서 나타난 바와 같이 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 및 에틸 아세테이트 분획물이 다양한 암세포주에 대하여 뛰어난 세포독성 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 3 내지 19 및 표 1).

표 1

다양한 암세포주에 대한 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 및 에틸 아세테이트 분획물의 세포독성 효과

암세포주 명칭		IC ₅₀ (μg/웰)	
		M	EA
정상 신장세포	293	5.48±0.59	3.29±0.35
대장암세포주	HCT116	2.56±0.07	2.42±0.10
	SW480	4.64±0.22	3.48±0.07
	WiDr	3.23±0.23	1.94±0.43
	LoVo	3.21±0.25	2.92±0.16
	HT29	4.96±0.24	3.14±0.15
폐암세포주	A549	3.38±0.55	3.33±0.30
	NCI-H358	4.28±0.25	3.19±0.31
간암세포주	HepG2	4.97±0.12	4.05±0.11
	LX-2	3.09±0.19	2.10±0.21
위암세포주	AGS	2.47±0.09	2.11±0.13
췌장암세포주	CHoi-CK	2.75±0.55	2.67±0.30
담도암세포주	HuCCCT-1	2.95±0.23	2.40±0.13
유방암세포주	MCF-7	2.47±0.09	2.11±0.13
	MDA-MD-231	1.80±0.31	1.99±0.31
전립선암세포주	PC-3	1.84±0.18	1.21±0.07
자궁경부암세포주	HeLa	2.72±0.14	2.21±0.52

M: 80% 메탄올을 추출용매로 한 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물

EA: 땃두릅나무의 에틸 아세테이트 분획물

<실험예 2> 땃두릅나무 분획물의 암세포에 대한 치사 효과(lethal effect)의 확인

땃두릅나무 분획물이 나타내는 암세포에 대한 치사 효과를 확인하기 위하여, 담도암세포주 HuCCCT-1을 대상으로 하는 집락 형성 분석(colony formation assay)를 수행하여 단일 세포가 집락을 형성하는 정도를 통해 세포의 재생 능력을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실험예 <1-1>에서 배양한 HuCCCT-1 세포를 60 파이 페트리-디쉬(60Φ petri-dish)에 0.5×10^3 세포/3 ml로 접종한 후, 5% 이산화탄소가 유지되는 37℃ 항온 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 <실시예 2>에서 제조한 땃두릅나무의 에틸 아세테이트 분획물을 웰 당 0.1, 0.2 및 0.5 μg 씩 처리하고, 3 일 마다 새로운 배지로 희석하면서 10 일 동안 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 배양 후에는 형성된 집락을 확인하여 100% 메틸 알코올(methyl alcohol)로 고정한 다음, 20% 검사 염색 용액(giemsa stain solution; 시그마 사)으로 염색하여 계수하였다. 대조군으로는 에틸 아세테이트 분획물을 첨가하지 않고 HuCCCT-1을 상기와 동일한 방법을 수행하여 배양하였다.

그 결과, 도 20 및 도 21에서 나타난 바와 같이 대조군에서의 집락 형성률은 매우 높게 나타난 것에 비해, 에틸 아세테이트 분획물을 첨가하였을 때 집락의 형성률이 분획물 농도 의존적으로 억제된 것을 확인하였다(도 20 및 도 21).

<실험예 3> 땃두릅나무 분획물의 세포사멸(apoptosis) 효과 확인

땃두릅나무 분획물이 나타내는 암세포에 대한 세포사멸 효과를 확인하기 위하여, 살아있는 세포의 세포막 인지

질 이중층(cell membrane phospholipide bilayer)에서는 세포 내에 위치하나 사멸 세포(apoptotic cell)의 세포막 인지질 이중층에서는 세포 바깥으로 이동하는 인산염 세린(phosphatidyl serine)에 특이적으로 결합하여 세포를 염색하는 아넥신 V(annexin V)를 사용하여 대장암세포 HCT116에서 세포사멸 효과를 확인하였다. 아울러, 세포사멸의 진행을 확인하기 위하여 초기의 세포사멸부터 확인이 가능한 아넥신 V와 함께, 세포사멸이 진행되어 세포막(plasma membrane)의 온전한 상태(integrity)가 손실됨을 통해 세포 내부로 진입한 후에 황적색(yellow-red) 형광의 민감도를 나타내는 프로피디움 요오드화물 (Propidium iodide; PI)을 사용하여 세포사멸 효과를 확인하였다.

[0081] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>에서 배양한 HCT116 세포를 6 웰 플레이트에 1×10^5 세포/3 ml로 접종한 후, 5% 이산화탄소가 유지되는 37℃ 항온 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 <실시예 2>에서 제조한 땃두릅나무의 에틸 아세테이트 분획물을 웰 당 3, 10, 20 및 50 ppm의 농도로 처리하고, 24 시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 배양 후에는 아넥신 V-FITC 세포사멸 감별 키트(Annexin V-FITC apoptosis detection kit; BioVision 사)의 제공되는 프로토콜에 따라 PI로 염색한 후 FACS 칼리버(FACS Calibur; 488nm 및 633nm 레이저)를 이용하여 유세포 분석(flow cytometry analysis)을 수행하였다.

[0082] 그 결과, 도 22 및 도 23에서 나타난 바와 같이 땃두릅나무의 에틸아세테이트 분획물 농도가 3, 10, 20 및 50 ppm으로 증가함에 따라, 세포의 생존률은 72.40%, 12.27%, 5.39% 및 0.94%로 현저하게 감소하였으며, 세포사멸 효과는 $28.33 \pm 3.17\%$, $84.91 \pm 0.67\%$, $73.54 \pm 3.12\%$ 및 $97.98 \pm 0.43\%$ 로 증가하는 것을 확인하였다(도 22 및 도 23).

[0083] <실험예 4> 땃두릅나무 분획물의 여드름균에 대한 항균 효과 확인

[0084] <4-1> 여드름균 배양

[0085] 본 발명의 실험예를 수행하기 위해 여드름균을 배양하였다.

[0086] 구체적으로, 그람 양성세균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*; KCTC 3314) 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*; KCTC 1916)을 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korea Biological Resource Center; KCTC)로부터 구입하였다. 동결 건조된 P. 아크네스 100 μ l를 3 g/l의 쇠고기 추출물(beef extract) 및 5 g/l의 펩톤(peptone)을 포함하는 액체 배지 10 ml에 접종하였고, 동결 건조된 S. 아우레우스 100 μ l는 3 g/l의 효모 추출물(Yeast extract), 1.5 g/l의 쇠고기 추출물 및 1 g/l의 포도당(glucose)을 포함하는 액체 배지 10 ml에 접종한 후, 37℃ 진탕배양기에서 12 시간 동안 전배양하였다. 그런 다음, 멸균한 50 ml 삼각플라스크에 상기 배지 10 ml를 첨가한 후, 3 시간 동안 진탕배양기에서 본배양하였다.

[0087] <4-2> 땃두릅나무 분획물의 항균 효과 확인

[0088] 땃두릅나무 분획물의 항균 효과를 확인하기 위하여, 고체배지를 이용한 종이 디스크 방법(paper disc method)을 수행하였다.

[0089] 구체적으로, 상기 실험예 <4-1>에서 배양한 P. 아크네스 및 S. 아우레우스를 도말평판배지에 5 ml을 도말하여 준비하였다. 상기 도말평판배지는 3 g/l 쇠고기 추출물, 5 g/l 펩톤 및 15 g/l 한천(agar)을 포함하도록 제조하여 P. 아크네스를 도말하였고, 3 g/l 효모 추출물, 1.5 g/l 쇠고기 추출물, 1 g/l 포도당 및 20 g/l 한천을 포함하도록 제조하여 S. 아우레우스를 도말하였다. 그런 다음, 상기 <실시예 2>에서 제조한 땃두릅나무의 에틸 아세테이트 분획물을 각 종이 디스크(직경 8 mm) 당 20 μ g이 되도록 흡수시켜 건조하였고, 상기 준비한 도말평판배지 위에 1000, 10000 및 10000 ppm의 농도에 맞게 밀착시킨 상태로 37℃의 배양기에서 24 시간 배양하여 디스크 주변에 생성된 투명한 환(clear zone)의 크기를 측정하여 항균활성을 비교하였다. 대조군으로는 테트라사이클린(tetracycline)을 10000 ppm으로 맞추어 상기 방법과 동일하게 수행하였다.

[0090] 그 결과, 하기 [표 2] 및, 도 24 및 도 25에서 나타난 바와 같이 땃두릅나무의 에틸아세테이트 분획물의 농도의존적으로 환의 크기가 커지므로, P. 아크네스 및 S. 아우레우스에 대하여 효과적인 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 2 및, 도 24 및 도 25).

표 2

[0091] P. 아크네스 및 S. 아우레우스에 대한 땃두릅나무 분획물의 항균활성 확인

추출물 및 대조군 농도		환의 직경(mm)	
		P. 아크네스	S. 아우레우스
땃두릅나무 분획물	100000 ppm	6	3
	10000 ppm	4	2
	1000 ppm	3	1
테트라사이클린	10000 ppm	10	15

[0092] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0093] <1-1> 산제의 제조

[0094] 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

[0095] 유당 1.5 g

[0096] 탈크 0.5 g

[0097] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0098] <1-2> 정제의 제조

[0099] 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

[0100] 락토오스 7.9 g

[0101] 결정성 셀룰로오스 1.5 g

[0102] 마그네슘 스테아레이트 0.5 g

[0103] 상기의 성분들을 혼합한 후 직타법(direct tableting method)으로 정제를 제조하였다.

[0104] <1-3> 캡슐제의 제조

[0105] 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

[0106] 옥수수전분 5 g

[0107] 카르복시 셀룰로오스 4.9 g

[0108] 상기의 성분들을 혼합하여 분말을 제조한 후, 상기 분말을 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라 경질 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0109] <1-4> 주사제의 제조

[0110] 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

[0111] 주사용 멸균 증류수 적량

[0112] pH 조절제 적량

[0113] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플 당(2 mL) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.

[0114] <1-5> 액제의 제조

[0115] 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 0.1 g

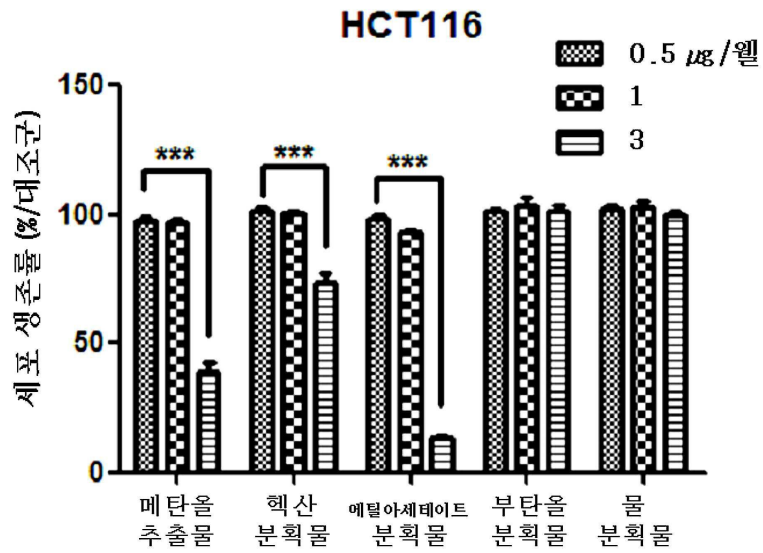
[0116] 이성화당 10 g

[0117]	만니톨	5 g
[0118]	정제수	적량
[0119]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고, 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합하였다. 그 다음 정제수를 가하여 전체 100 로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.	
[0120]	<제조예 2> 건강식품의 제조	
[0121]	<2-1> 밀가루 식품의 제조	
[0122]	본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이를 혼합한 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.	
[0123]	<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조	
[0124]	본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 0.1 ~ 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.	
[0125]	<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조	
[0126]	본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.	
[0127]	<2-4> 유제품(dairy products)의 제조	
[0128]	본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.	
[0129]	<2-5> 전식의 제조	
[0130]	현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0131]	검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.	
[0132]	본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.	
[0133]	상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및, 본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물을 하기의 비율로 배합하여 제조하였다.	
[0134]	곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),	
[0135]	종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),	
[0136]	본 발명의 땃두릅나무 추출물 또는 이의 분획물(3 중량부),	
[0137]	영지(0.5 중량부),	
[0138]	지황(0.5 중량부)	
[0139]	<2-6> 건강보조식품의 제조	

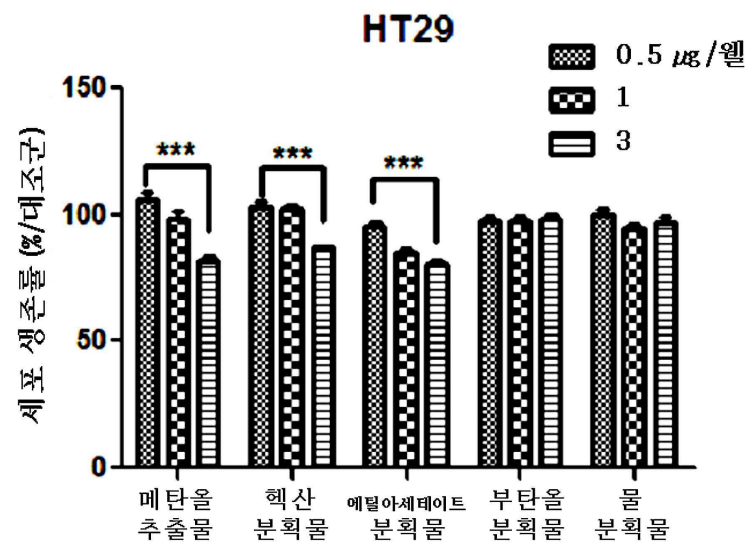
[0140]	본 발명의 맛두릅나무 추출물 또는 이의 분획물	100 mg
[0141]	비타민 혼합물	적량
[0142]	비타민 A 아세테이트	70 μ g
[0143]	비타민 E	1.0 mg
[0144]	비타민 B1	0.13 mg
[0145]	비타민 B2	0.15 mg
[0146]	비타민 B6	0.5 mg
[0147]	비타민 B12	0.2 μ g
[0148]	비타민 C	10 mg
[0149]	비오틴	10 μ g
[0150]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0151]	엽산	50 μ g
[0152]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0153]	무기질 혼합물	적량
[0154]	황산제1철	1.75 mg
[0155]	산화아연	0.82 mg
[0156]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0157]	제1인산칼륨	15 mg
[0158]	제2인산칼슘	55 mg
[0159]	구연산칼륨	90 mg
[0160]	탄산칼슘	100 mg
[0161]	염화마그네슘	24.8 mg
[0162]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였으나, 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.	

도면

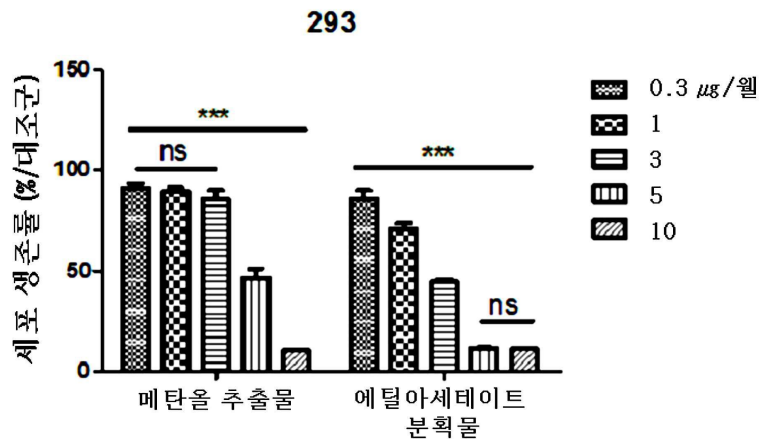
도면1



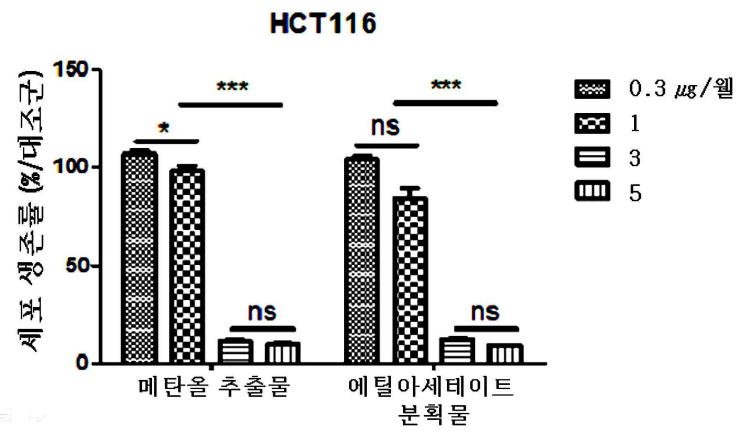
도면2



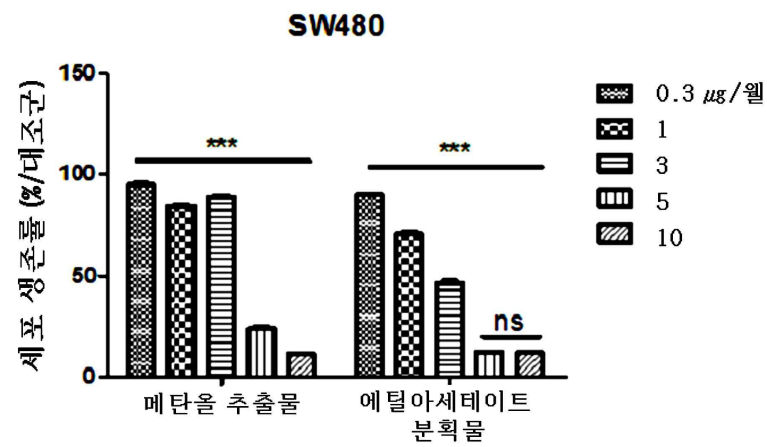
도면3



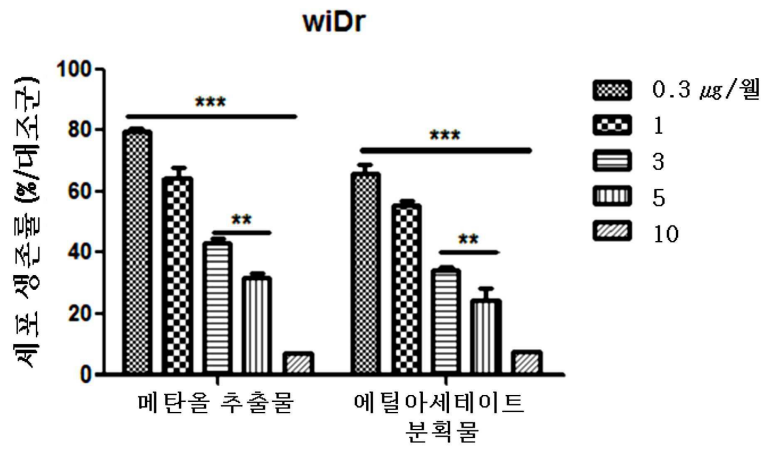
도면4



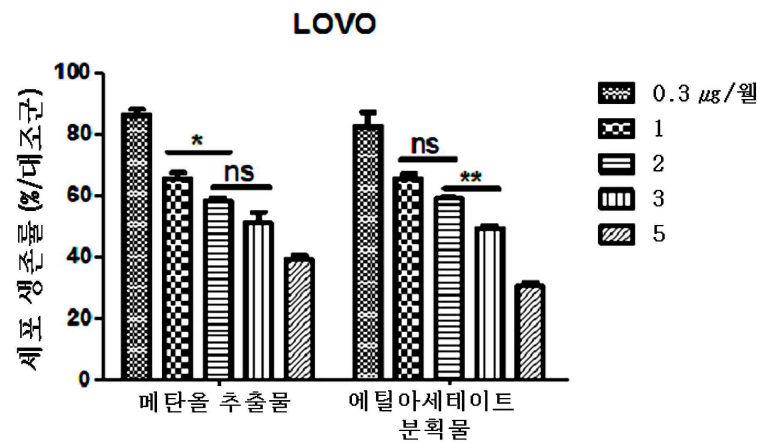
도면5



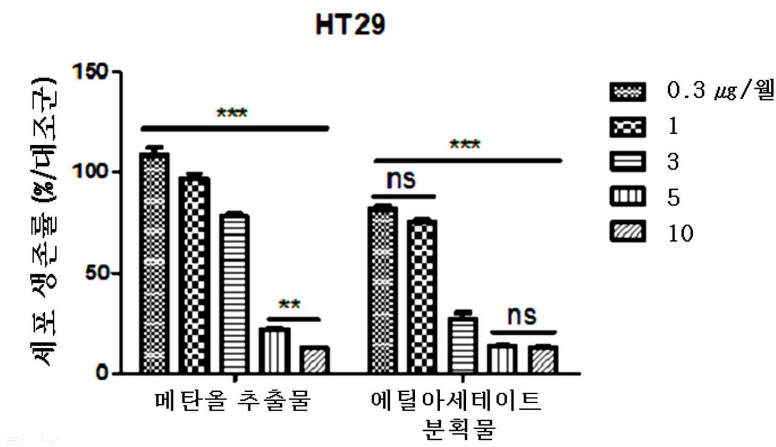
도면6



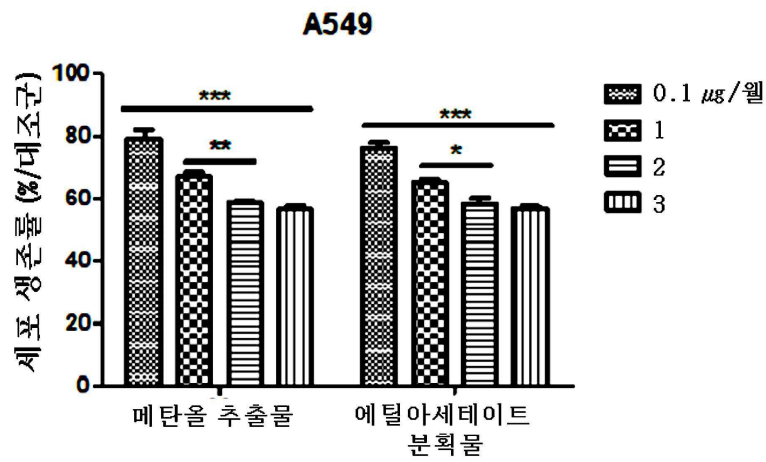
도면7



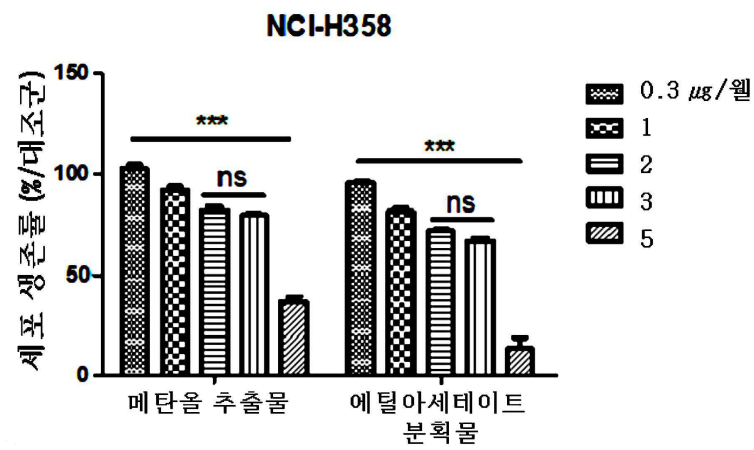
도면8



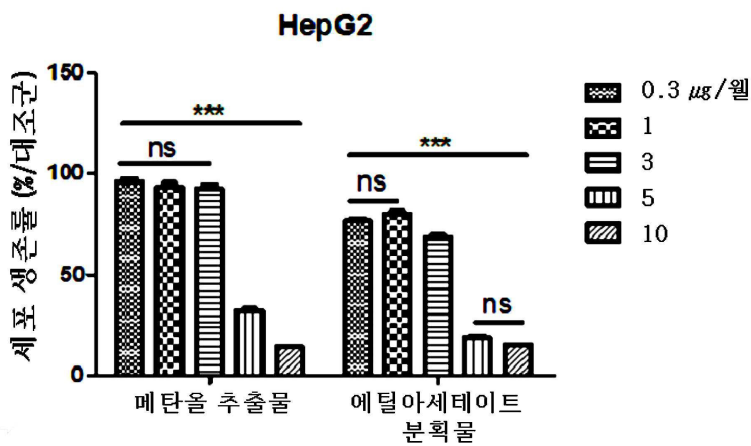
도면9



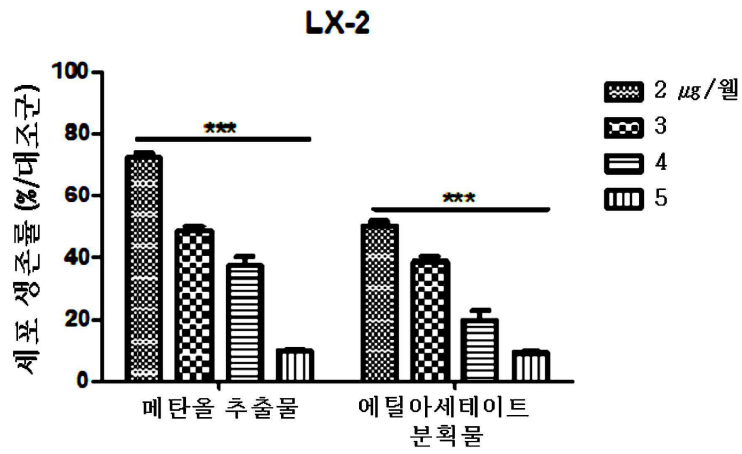
도면10



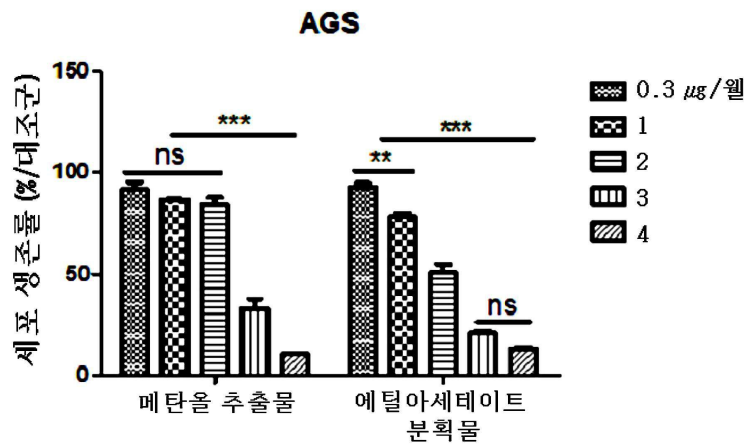
도면11



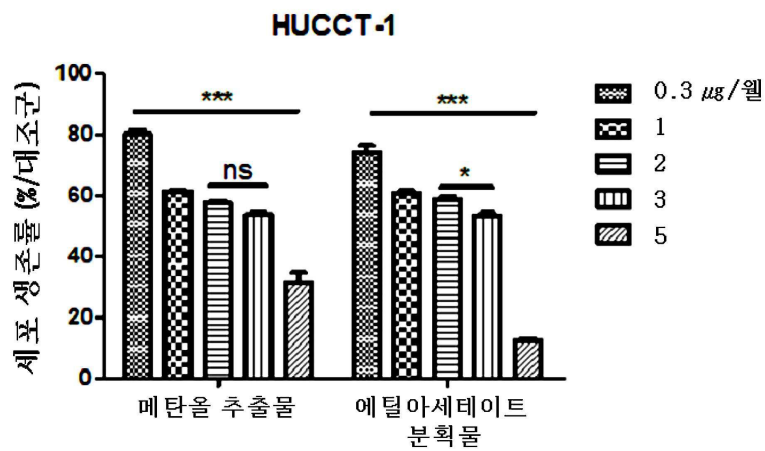
도면12



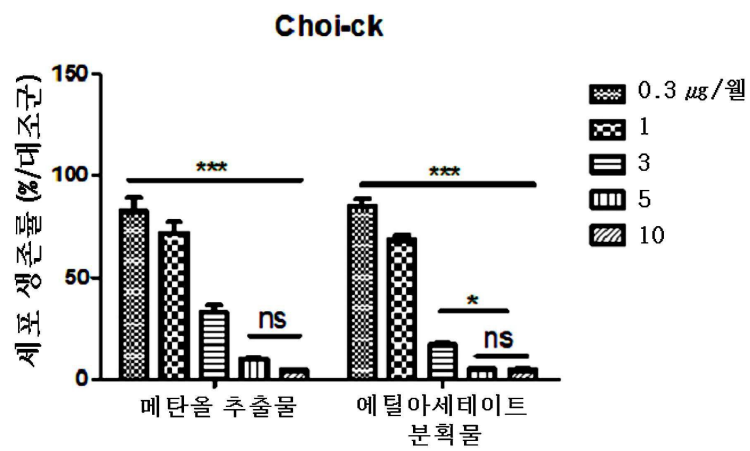
도면13



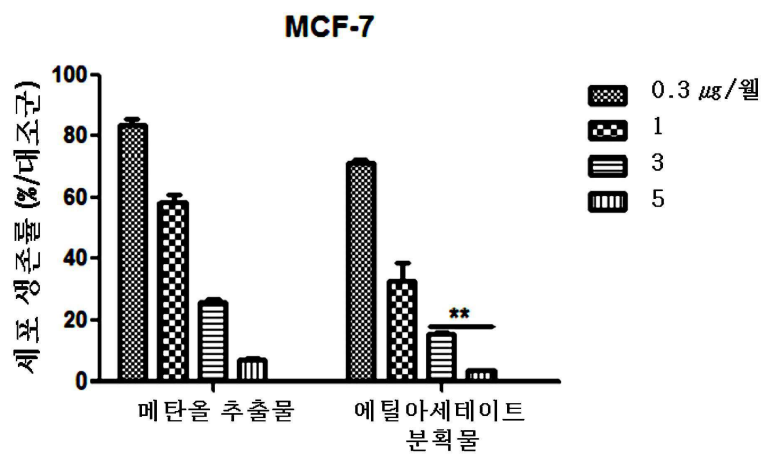
도면14



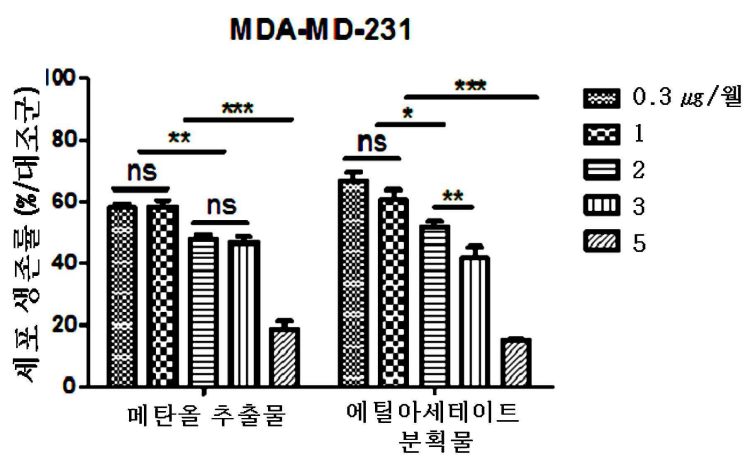
도면15



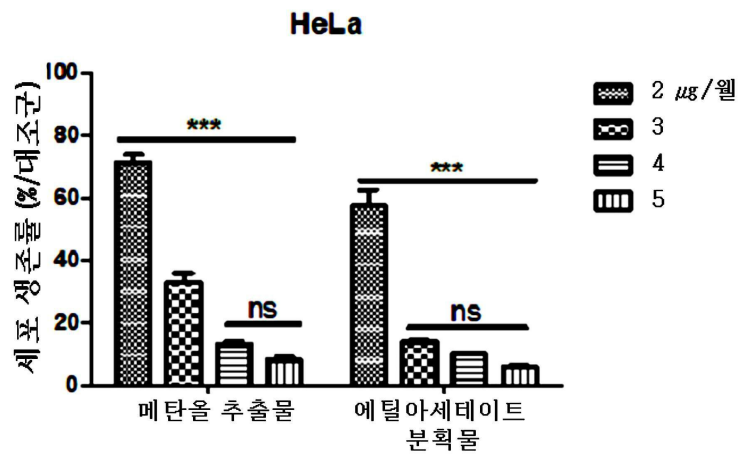
도면16



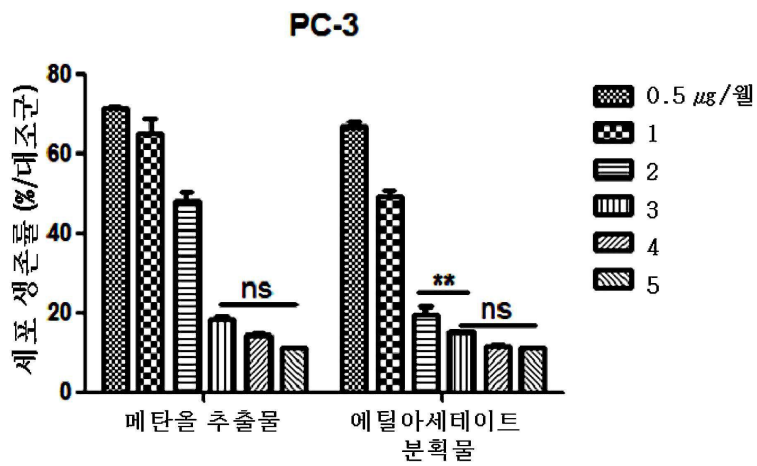
도면17



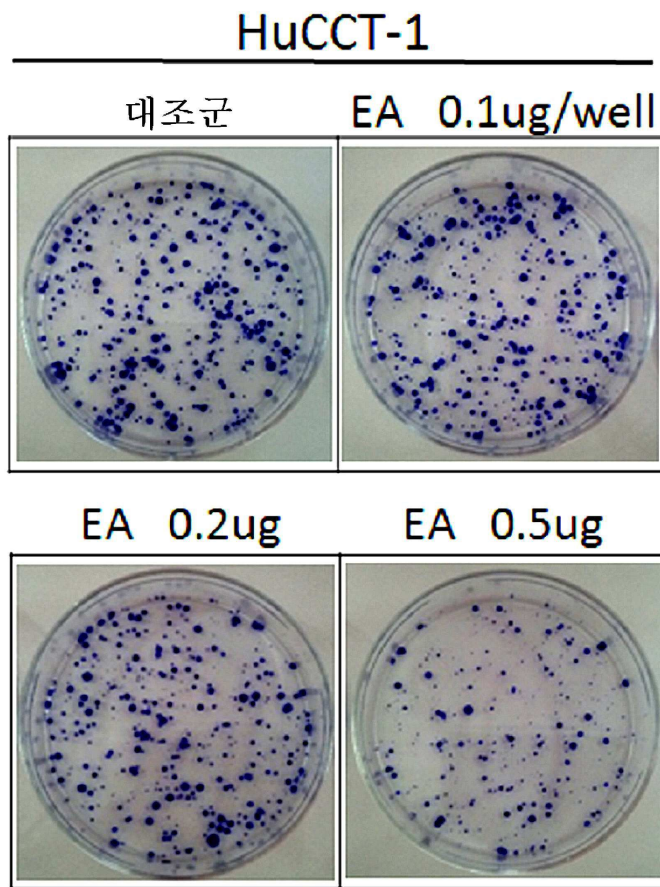
도면18



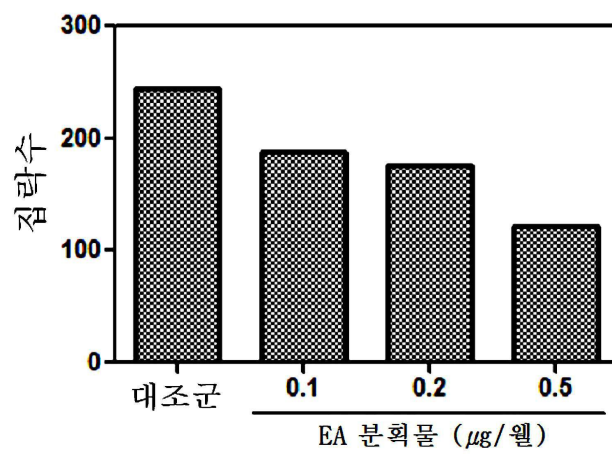
도면19



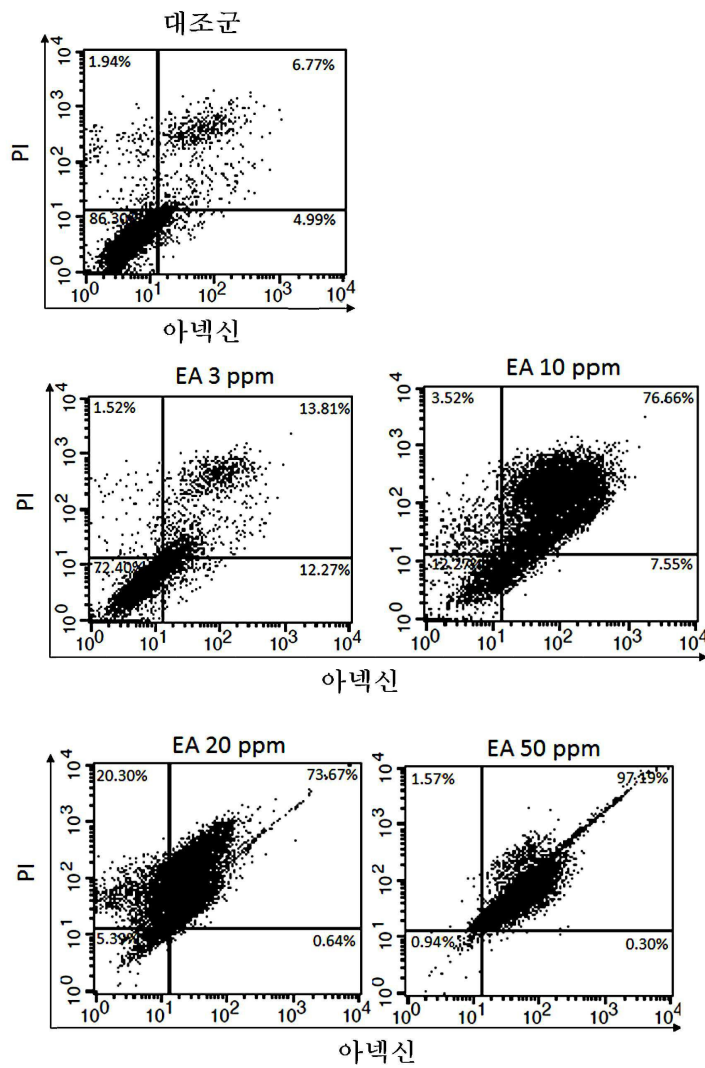
도면20



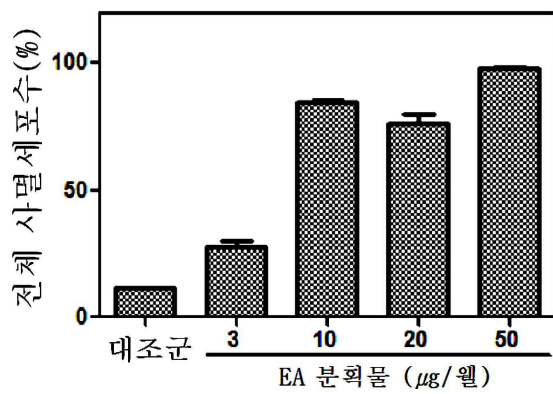
도면21



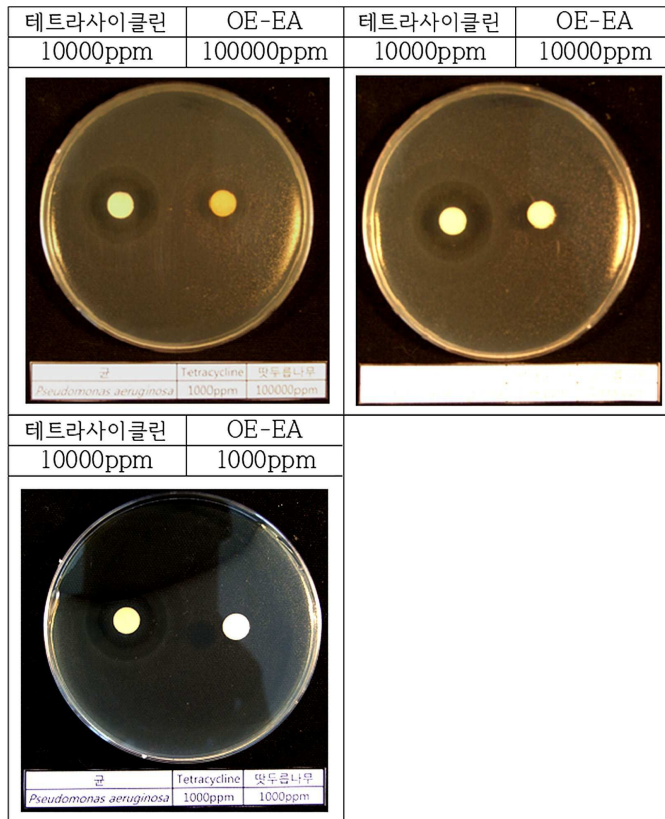
도면22



도면23



도면24



도면25

테트라사이클린 10000ppm	OE-EA 100000ppm	OE-EA	100000ppm												
 <table><tr><td>균</td><td>Tetracycline</td><td>씻두릅나무</td></tr><tr><td><i>Staphylococcus aureus</i></td><td>10000ppm</td><td>100000ppm</td></tr></table>		균	Tetracycline	씻두릅나무	<i>Staphylococcus aureus</i>	10000ppm	100000ppm	 <table><tr><td>균</td><td colspan="2">씻두릅나무</td></tr><tr><td><i>Staphylococcus aureus</i></td><td colspan="2">100000ppm</td></tr></table>		균	씻두릅나무		<i>Staphylococcus aureus</i>	100000ppm	
균	Tetracycline	씻두릅나무													
<i>Staphylococcus aureus</i>	10000ppm	100000ppm													
균	씻두릅나무														
<i>Staphylococcus aureus</i>	100000ppm														
테트라사이클린 10000ppm	OE-EA 10000ppm	테트라사이클린 10000ppm	OE-EA 1000ppm												
 <table><tr><td>균</td><td>Tetracycline</td><td>씻두릅나무</td></tr><tr><td><i>Staphylococcus aureus</i></td><td>1000ppm</td><td>10000ppm</td></tr></table>		균	Tetracycline	씻두릅나무	<i>Staphylococcus aureus</i>	1000ppm	10000ppm	 <table><tr><td>균</td><td>Tetracycline</td><td>씻두릅나무</td></tr><tr><td><i>Staphylococcus aureus</i></td><td>1000ppm</td><td>1000ppm</td></tr></table>		균	Tetracycline	씻두릅나무	<i>Staphylococcus aureus</i>	1000ppm	1000ppm
균	Tetracycline	씻두릅나무													
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000ppm	10000ppm													
균	Tetracycline	씻두릅나무													
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000ppm	1000ppm													