(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0024197
(43) 공개일자 2011년03월09일

(51) Int. Cl.
A61K 36/87 (2006.01) *A61P 37/08* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0082093
(22) 출원일자 2009년09월01일
심사청구일자 2009년09월01일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구 달서구 신당동 1000번지
(72) 발명자
양선아
대구광역시 수성구 범어4동 서한두레맨션 102동 1002호
이삼빈
대구광역시 달서구 이곡동 무지개타운 102동 306호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인명문

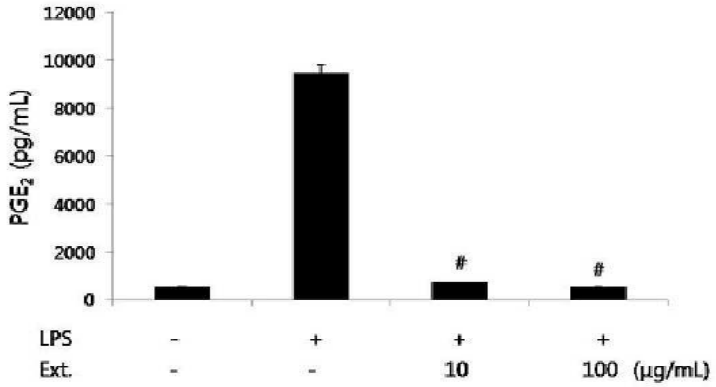
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 개다래 박 추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 염증 또는 알러지 예방 및 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 개다래 박 추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 염증 또는 알러지 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 개다래의 생리활성 성분은 그대로 유지하면서 개다래 특유의 강한 향과 맛이 제거된 개다래 박 추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 염증 또는 알러지 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물의 제조방법은 (a) 개다래를 초임계유체 추출장치로 초임계 추출하는 단계; (b) 상기 초임계 추출 후 남아있는 개다래 박을 회수하는 단계; (c) 상기 개다래 박을 증류수, 에탄올(식용주정) 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 용매로 추출하는 단계; 및 (d) 상기 추출된 개다래 박 추출물을 회수하는 단계를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최희돈

서울특별시 송파구 신천동 20번지 파크리오아파트 225동 2504호

유미희

대구광역시 달성군 다사읍 죽곡리 대실역 e-편한세상 101동 1810호

최준혁

대구광역시 남구 대명5동 1692-6 나원하이츠 501호

이은정

대구광역시 서구 평리4동 1354-1번지 동서3차 나동 603호

채인경

대구광역시 북구 노원동2가 157-4번지

임효권

대구광역시 달성군 다사읍 죽곡리 대실역 e-편한세상 101동 1810호

임남경

대구광역시 서구 중리동 중리시영2차 12-103

김민주

대구광역시 달서구 신당동 1706-13번지

김형대

대구광역시 달성군 가창면 정대2리 911번지 (비슬청록농장)

이인선

대구광역시 수성구 황금동 롯데화성캐슬골드파크 1416-1803

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 개다래를 초임계유체 추출장치로 초임계 추출하는 단계;

(b) 상기 초임계 추출 후 남아있는 개다래 박을 회수하는 단계;

(c) 상기 개다래 박을 증류수, 에탄올 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 용매로 추출하는 단계; 및

(d) 상기 추출된 개다래 박 추출물을 회수하는 단계를 포함하는 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제조방법은 상기 회수된 개다래 박 추출물을 여과 및 동결건조시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 개다래 박 추출물의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 초임계 추출은 35~55℃의 온도, 1500~6000의 압력(psi) 및 1~3mL/min의 CO_2 유속으로 1~2시간 수행되는 것을 특징으로 하는 개다래 박 추출물의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 용매로 추출하는 단계는 개다래 박을 용매에 침지시키고, 70~100℃의 온도로 30분~90분간 가열하는 것을 특징으로 하는 개다래 박 추출물의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 용매로 추출하는 단계는 개다래 박을 용매에 침지시키고, 상온에서 24시간 정치하여 추출하는 것을 특징으로 하는 개다래 박 추출물의 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물을 함유하는 염증 또는 알러지 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물은 개다래 전체성분중 지방이 1% 미만인 것을 특징으로 하는 염증 또는 알러지 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물을 함유하는 염증 또는 알러지 예방용 기능성 식품.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물은 개다래 전체성분중 지방이 1% 미만인 것을 특징으로 하는 염증 또는 알러지 예방용 기능성 식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 개다래 박 추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 염증 또는 알러지 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 개다래의 생리활성 성분은 그대로 유지하면서 개다래 특유의 강한 향과 맛이 제거된

개다래 박 추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 염증 또는 알러지 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증이란 신체 국소에 일어나는 상해에 대하여 생체조직의 방어반응이다. 즉, 각종의 유해한 자극(stressor)에 응답하여, 자극에 의한 상해를 제거하여 원래의 상태로 회복하려는 생체방어반응이 염증반응이다. 염증의 자극에는, 감염 혹은 화학적, 물리적 자극 등이 있다. 염증반응에 관련된 생체구성인자는 자유라디칼(free radical), 단백질, 당질, 지질 등의 저분자나 고분자의 화학물질과, 혈장, 혈구, 혈관 및 결합조직 등이 있다.

[0003] 염증의 과정은 보통 2가지로 나누며, 급성염증과 만성염증으로 나눌 수 있다. 급성염증은 수일이내의 단기적인 반응이며, 혈장성분이나 혈구 등이 미소순환계를 게재하여 이물 제거에 관련한다. 만성염증은 지속시간이 길며, 조직의 증식 등이 수반된다.

[0004] 알러지성 질환은 대부분이 항원-항체 반응에 의해 활성화된 조직의 비만세포의 과립으로부터 유리되는 화학매개체들 (주로 histamine, prostaglandins, leukotrienes, TNFα, cytokines 등)에 의해서 야기된다. 현재 사용되는 알러지 치료 약물들의 용도는 증상완화에 머무르고 있기 때문에 보다 근본적인 치료 약물의 개발이 절실히 요구된다.

[0005] 염증 및 알러지성 질환을 유도하는 핵심적인 매개물질은 프로스타글란딘류 (prostaglandindes), 류코티리엔류 (leukotriens), 혈소판활성화인자 (PAF), 포스포리파제 A2 (phospholipase A2), 사이클로옥시게나제 (cyclooxygenase) 및 리폭시게나제 (lipoxygenase)에 의하여 전구체인 아라키돈산 (arachidonic acid)로부터 생성된다. 또한 니트릭옥사이드(nitric oxide; NO)를 발생시키는 효소인 니트릭옥사이드 신타제 (nitric oxide synthase; NOS) 생합성과 관련된 효소도 염증 반응을 매개하는데 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있으며, 따라서 L-아르기닌(L-Arginine)으로부터 NO를 생성시키는 효소인 NOS도 염증을 차단하는데 있어서 주된 목표가 되고 있다. 최근의 연구 결과에 따르면, NOS는 몇 가지 종류가 존재하는데 뇌에 존재하는 bNOS(brain NOS), 신경계에 존재하는 nNOS(neuronal NOS), 혈관계에 존재하는 eNOS (endothelial NOS) 등은 체내에 항상 일정수준으로 발현되고 있으며, 이들에 의해 소량 생성되는 NO는 신경전달이나 혈관확장을 유도하는 등 정상적인 신체의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데 반하여, 각종 염증성 사이토카인(cytokines)이나 리포폴리 사카라이드 (lipopolyssacharide, LPS)등과 같은 외부 자극물질에 의해 유도되는 iNOS(induced NOS)에 의해 급격히 과량 발생되는 NO는 세포독성이나 각종 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 만성 염증은 iNOS 활성의 증가와 관련 있다는 연구가 있다(Miller M. J. et al., Mediators of inflammation, 4, pp387-396, 1995: Appleton L. et al., Adv. Pharmacol., 35, pp27-28, 1996).

[0006] 상기의 염증성질환을 치료하기 위하여, 여러 종류의 염증성 질환치료제가 개발되었는데, 현재까지 보고된 염증성 질환 치료물질은 급성염증에서 손상된 조직세포, 염증에 관여하는 세포 또는 주화인자 (Chemotactic factor)에 의해 유도되는 백혈구의 세포막으로부터 에이코사노이드이 생성을 억제하는 약물이다. 또한 알러지제도 항원-항체 반응시 유리되는 탈 과립 반응 억제, 히스타민 수용체 차단, 류코트리엔 생성 억제 및 류코트리엔 수용체 차단을 억제하는 약물들이다.

[0007] 한국특허출원 제92-11752호에서는 인동(*Lonicera japonica*)으로부터 얻는 바이후라보노이드(biflavonoid)의 항염증, 항알러지 및 항류마티스 작용제에 관해 개시하였고, 한국특허 등록 제100744호에서는 은행잎으로부터 얻은 바이플라보노이드 (biflavonoid)를 함유하는 항염증, 항알러지 및 항류마티스 작용약제를 개시한 바 있다.

[0008] 한편, 개다래(*Actinidia polygama*)는 다래나무(미후리)과 (Actinidiaceae)에 속한 낙엽 덩굴성 식물인 개다래나무의 과실로, 이에 대한 성분으로는 자당, 점액질, 전분, 단백질, 탄닌, 유기산, 비타민 C, 비타민 A, 비타민 P 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 지금까지 알려진 효과로는 지갈(止渴), 해번열(解煩熱)과 비뇨기결석(泌尿器結石) 치료가 있다(정보섭 및 신민교, 향약대사전, 영림사, p386-387, 1998).

[0009] 한국특허 등록 제0511550호에서는 다래 추출물을 함유하는 알러지성 질환 및 비알러지성염증 질환의 치료 및 예방을 위한 약학 조성물을 개시하였는데, 이는 다래를 통상의 유기용매 추출법으로 추출하였기 때문에, 다래 특유의 강한 향과 맛을 간직하고 있어, 환자나 어린이 등 향과 맛에 민감한 사람들을 대상으로 가공제품 또는 의약품에 적합하지 못한 문제점이 있었다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 개다래를 특정 조건에서 초임계 추출하여 개다래 고유의 향을 나타내는 향기 성분을 제거시킨 개다래 박을 용매로 추출할 경우, 개다래의 생리활성 성분은 그대로 유지하면서 개다래 특유의 강한 향과 맛이 제거된 개다래 박 추출물을 획득할 수 있다는 사실을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 개다래의 생리활성 성분은 그대로 유지하면서 개다래 특유의 강한 향과 맛이 제거된 개다래 박 추출물의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 개다래의 생리활성 성분은 그대로 유지하면서 개다래 특유의 강한 향과 맛이 제거된 개다래 박 추출물을 함유하는 염증 및 알러지 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 개다래를 초임계유체 추출장치로 초임계 추출하는 단계; (b) 상기 초임계 추출 후 남아있는 개다래 박을 회수하는 단계; (c) 상기 개다래 박을 증류수, 에탄올 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 용매로 추출하는 단계; 및 (d) 상기 추출된 개다래 박 추출물을 회수하는 단계를 포함하는 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 상기 방법으로 제조된 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물을 함유하는 염증 또는 알러지 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물을 함유하는 염증 또는 알러지 예방용 기능성 식품을 제공한다.

효 과

[0016] 본 발명에 따른 개다래 박 추출물의 제조방법을 이용할 경우, 개다래가 지닌 다양한 생리활성 성분은 그대로 유지하면서, 개다래 특유의 강한 향과 맛을 간단하고, 효과적으로 제거할 수 있으며, 이로부터 제조된 개다래 박 추출물은 환자나 어린이 등 개다래의 향과 맛에 민감한 사람들을 대상으로 한 기능성 식품 또는 치료용 약학 조성물의 제조에 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명에서는 초임계 유체 추출장치를 이용할 경우, 개다래가 지닌 다양한 생리활성 성분은 그대로 유지하면서, 개다래 특유의 강한 향과 맛을 나타내는 성분을 간단하고, 효과적으로 제거할 수 있는지를 확인하고자 하였다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에서는, 초임계 유체 추출장치로 개다래를 추출하고, 남아있는 개다래 박을 회수한 후, 개다래 박을 용매로 추출시켜 개다래 박 추출물을 제조하였다. 개다래 박 추출물의 성분을 확인한 결과, 개다래 특유의 향과 맛을 나타내는 성분은 감소하고, 단백질, 회분, 탄수화물, 유리당 등의 성분은 그대로 유지하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0019] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 개다래를 초임계유체 추출장치로 초임계 추출하는 단계; (b) 상기 초임계 추출 후 남아있는 개다래 박을 회수하는 단계; (c) 상기 개다래 박을 증류수, 에탄올 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 용매로 추출하는 단계; 및 (d) 상기 추출된 개다래 박 추출물을 회수하는 단계를 포함하는 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

[0020] 상기 개다래는 말다래 나무라고도 하며, 깊은 산속 나무 밑이나 계곡에서 자란다. 길이는 약 5m로 줄기 속이 희

고, 잔가지에는 어릴 때 연한 갈색 털이 나는데 드물게 가시 같은 억센 털이 나기도 한다. 개다래의 잎은 어긋나고 막질(膜質)이며 넓은 달걀 모양 또는 타원형이고 끝이 점점 뾰족하며, 잎맥 위에 갈색 털이 나며 잔 톱니가 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 6~7월에 가지 윗부분 잎겨드랑이에 지름 1.5㎝의 흰색 꽃이 3~10개 달린다. 개다래 열매는 장과로 긴 타원형이고 9~10월에 누렇게 익으며 아래로 늘어진다.

[0021] 본 발명에서는 개다래의 열매를 사용하는 것이 바람직하며, 개다래 열매를 건조시킨 것을 "목천료"라고도 한다.

[0022] 일반적으로 초임계 유체란 초임계 대상 물질 즉, 이산화탄소, 물, 알코올, 헬륨 등의 물질에 임계 압력, 임계 온도를 가하여 고온 고압 상태하의 특수 상황에서 유체가 된 것을 의미한다. 이 초임계 유체는 액체의 밀도와 비슷한 값을 가지며, 점도는 기체에 가까우며 그 확산 계수는 액체보다 약 100배 정도의 큰 값을 가지게 된다. 그러므로, 이러한 초임계 유체를 추출 대상에 침투시켜 추출을 원하는 내용물과 반응시키면 고순도의 내용물을 추출할 수 있게 된다.

[0023] 상기 초임계 추출은 35~55℃의 온도, 1500~6000psi.의 압력(psi) 및 1~3mL/min의 CO_2 유속으로 1~2시간 수행되는 것을 특징으로 한다. 상기 초임계 추출시 온도, 압력 및 시간은 상호 복합적으로 영향을 미치고 있으나, 상기 각각의 조건들이 범위를 벗어날 경우, 추출 수율이 낮아지거나 더 이상 증가하지 않아 경제적으로 바람직하지 못한 문제점이 있다. 온도, 압력, 추출시간을 고려해보면 약 45℃, 4500psi에서 1시간 동안 추출하는 것이 바람직하다.

[0024] 또한, 상기 CO_2 유속이 1mL/min 미만인 경우, 크게 추출수율이 낮아지고 또한 추출시간이 많이 소요되는 문제가 있고, 3mL/min를 초과할 경우, 추출수율이 더 이상 증가하지 않는 문제가 있다.

[0025] 개다래를 초임계 유체 추출장치로 추출할 경우, 개다래 고유의 향 및 맛과 관련된 지용성 성분이 추출된다. 추출 후 잔존하는 개다래 박은 다시 개다래의 생리활성 추출을 위해 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 용매 추출은 개다래 박을 용매에 침지시키고, 상온에서 24시간 정치하여 추출 또는 70~100℃에서 1시간 추출하는 것일 수 있다.

[0027] 상기 용매로는 증류수, 에탄올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 용매 추출시 온도는 사용되는 용매에 따라 달라질 수 있으나 70~100℃인 것이 바람직하다. 가령 에탄올 함량이 많을 경우 70~80℃, 증류수 함량이 많을 경우, 90~100℃에서 추출하는 것이 바람직하다. 본 발명에 있어서 상기 에탄올은 식용주정을 사용하는 것이 바람직하다.

[0028] 본 발명에 따른 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물의 제조방법은 상기 개다래 박 추출물을 회수한 다음, 상기 회수된 개다래 박 추출물을 여과 및 동결건조시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 여과는 거름종이를 이용하여 수행할 수 있으며, 동결건조는 개다래 박 추출물을 동결시키고 감압(減壓)함으로써 얼음을 승화시켜 수분을 제거시키는 통상의 방법과 동일하게 수행할 수 있다.

[0029] 한편, 상기 개다래의 초임계 유체 추출시, 개다래가 지닌 생리활성 성분이 추출되지 않았다면 개다래 박에 생리활성 성분이 잔존하고 있으므로, 개다래 박 추출물이 항염증 및 항알러지 효과를 나타낼 것으로 예측하였다.

[0030] 본 발명의 다른 실시예에서는 개다래 박 추출물에 대한 항염증 및 항알러지 활성 실험을 수행한 결과, 개다래 박 추출물이 항염증 및 항알러지 활성이 우수하다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0031] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물을 함유하는 염증 또는 알러지 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0032] 상기 약학 조성물은 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 또한 통상적인 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 시럽 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 주사제 등의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 투여 형태가 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합 뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물을 함유하는 염증 또는 알러지 예방용 기능성 식품에 관한 것이다.

[0035] 상기 기능성 식품은 개다래 박 추출물과 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있다.

[0036] 기능성 식품은 바람직하게는 정제, 과립제, 연질캅셀제, 액제 제형, 음료 및 다류 중 선택된 것일 수 있으며, 이때 인체에 흡수되어 염증 또는 알러지 예방능이 발현될 수 있도록, 개다래 박 추출물을 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.1중량% 이상 포함하는 것이 바람직하다.

[0037] 이때의 상기 개다래(*Actinidia polygama*) 박 추출물은 개다래 특유의 향기 성분이 줄어들어 섭취에 거부감이 없으며, 이러한 향기성분이 포함되는 지방이 개다래 전체성분 중 1% 미만인 것일 수 있다.

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0039] **<실시예 1> 개다래 초임계 추출 및 개다래 박의 회수**

[0040] 초임계유체추출장치(SFT-100XW, Supercritical fluid technologies, Inc., USA)를 사용하여 표 1의 조건으로 개다래(열매)를 추출하였다. 즉, 시료 40 g을 100 mL의 추출조에 넣고, 일정한 온도와 압력의 추출조건(표 1)에서 2 mL/min의 CO_2 유속의 dynamic mode에서 추출한 후, 추출물 및 잔존하는 개다래 박을 회수하였다. 추출물의 수율은 하기 표 2에 나타내었다.

표 1

[0041]

구 분	추출 조건
온 도 (℃)	35, 45, 55
압 력 (psi)	1500, 3000, 4500, 6000
시 간 (hr)	1, 2

표 2

[0042]

온 도 (℃)	압 력 (psi)	시 간	
		1 hr(%)	2 hr(%)
35℃	1500	0.15±0.02	0.31±0.07
	3000	0.38±0.01	0.52±0.02
	4500	0.50±0.03	0.55±0.09
	6000	0.41±0.01	0.53±0.02
45℃	1500	0.09±0.01	0.18±0.04
	3000	0.34±0.06	0.48±0.04
	4500	0.65±0.03	0.72±0.04
	6000	0.45±0.02	0.51±0.03
55℃	1500	0.02±0.00	0.07±0.01
	3000	0.31±0.03	0.49±0.02
	4500	0.36±0.01	0.76±0.11
	6000	0.32±0.02	0.52±0.02

[0043] 표 2에 나타난 바와 같이 개다래의 초임계 추출 수율은 동일한 온도에서는 압력이 증가할수록 증가하는 것으로 나타났으며, 동일한 압력에는 온도가 증가할수록 감소하는 경향이었다. 또한 동일한 온도, 압력일 경우 추출시간이 길어질수록 증가하였다. 특히 45, 55℃에서 압력이 3000 psi에서 4500 psi로 증가할 경우 수율이 2배 정도 증가하는 경향을 나타내었으나, 45℃, 4500 psi의 경우 1시간 추출시 0.65±0.03%에서 2시간 추출시 0.72±0.04%로 시간이 증가하여도 추출수율이 크게 증가하지 않는 것으로 나타났다. 온도, 압력, 추출시간을 고려하여 볼 때 45℃, 4500 psi에서 1시간 동안 추출하는 것이 가장 바람직할 것으로 판단된다.

[0044] **<실험예 1> 개다래 및 개다래 박의 성분 비교**

[0045] 개다래와 개다래를 45℃, 4500 psi, 1시간에서 초임계 추출 후 남는 박(개다래 박)의 일반성분, 유리당, 유리

아미노산, 향기성분 등을 비교하였다. 일반성분(표 3)에서 지방의 경우 개다래 1.17%에서 개다래 박 0.48%로 크게 감소된 값을 나타내어 초임계 추출에 의해 개다래의 지용성 성분인 지방이 상당량 추출됨을 알 수 있었으며, 이외의 성분들은 거의 유사한 값을 나타내었다. 또한 유리 아미노산(표 4)과 유리당(표 5)의 경우에도 개다래와 개다래 박이 거의 유사한 값을 나타내어 초임계 추출이 개다래의 유리당과 유리 아미노산 값에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 연속수증기 증류추출장치를 이용하여 개다래와 개다래 박의 향기성분(지용성 에센셜 오일)을 추출한 후 GC로 분석한 결과(표 6), 총 향기성분 함량이 개다래 99.7±14.4 mg/kg에서 개다래 박 58.0±5.8 mg/kg으로 크게 감소하는 것으로 나타나 개다래 고유의 향기성분이 초임계 추출에 의해 상당히 제거되어 감소하는 것을 알 수 있었다.

표 3

[0046]

항 목	개다래(%)	개다래 박(%)
수 분	4.67	4.44
지 방	1.17	0.48
단백질	14.81	14.98
회 분	6.95	7.00
탄수화물	72.40	73.10

표 4

[0047]

아미노산	개다래(㎍/mg)	개다래박(㎍/mg)
Cys	0.55	0.60
ASP	0.52	0.51
GLU	0.24	0.24
ASN	1.72	1.75
SER	0.23	0.23
GLN	0.81	0.82
GLY	0.05	0.05
HIS	0.08	0.07
ARG	3.55	3.61
THR	0.10	0.11
ALA	0.97	0.97
PRO	0.18	0.18
TYR	0.20	0.23
VAL	0.19	0.20
MET	0.07	0.06
Cys2	0.04	0.05
ILE	0.08	0.08
LEU	0.06	0.06
PHE	0.30	0.31
TRP	0.46	0.52
LYS	0.33	0.33
Total	10.73	10.97

표 5

[0048]

유리당	개다래(%)	개다래 박(%)
Fructose	1.44	1.57
Glucose	1.76	1.62
Sucrose	0.84	0.67

표 6

[0049]

	개다래	개다래 박
총 향기성분 함량 (mg/kg)	99.7±14.4	58.0±5.8

[0050] **<실시예 2> 개다래 박의 열수 및 주정추출물의 제조**

[0051] 실시예 1의 45℃, 4500 psi, 1시간 조건에서 회수한 개다래 박 40g을 증류수 및 75% 에탄올(식용주정)로 추출하였다. 증류수의 경우, 개다래 박 및 개다래 박 중량의 20배에 해당하는 증류수를 플라스크에 넣은 후 90℃에서 1시간 동안 추출하였으며, 75%의 에탄올(식용주정)의 경우, 개다래 박 및 개다래 박 중량의 20배에 해당하는 75% 에탄올(식용주정)을 플라스크에 넣은 후, 80℃에서 1시간 동안 추출하였다. 추출물은 여과 후, 동결건조시켰다.

[0052] **<비교예 1> 개다래의 열수 및 주정추출물의 제조**

[0053] 개다래 박 대신 개다래를 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 방법으로 증류수 및 75% 에탄올(식용주정)을 이용하여 개다래를 추출하였다.

[0054] **<실험예 2> 개다래 및 개다래 박의 열수 및 주정추출물의 특성 비교**

[0055] 실시예 2 및 비교예 1에서 추출된 개다래와 개다래 박의 열수추출물과 주정추출물의 수율을 확인하고, 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량을 GC로 분석하여, 그 결과를 표 7에 나타내었다.

표 7

[0056]

	추출물	수율 (%)	총 플라보노이드 (ppm/catechin)	총 폴리페놀 (ppm/gallic acid)
개다래	열수추출물	31.1±0.5	21.2±0.5	85.0±0.6
	주정추출물	21.8±1.5	26.8±0.8	95.6±1.2
개다래 박	열수추출물	33.6±1.4	22.3±0.3	85.9±1.0
	주정추출물	21.3±0.4	27.3±0.6	95.9±1.9

[0057] 표 7에 나타난 바와 같이, 열수추출물(31.1±0.5 ~ 33.6±1.4%)이 주정추출물(21.3±0.4 ~ 21.8±1.5%)에 비해 높은 수율을 나타내었지만 개다래와 개다래 박의 차이는 거의 없는 것을 확인하였다.

[0058] 총 플라보노이드와 총 폴리페놀 함량도 주정추출물이 열수추출물에 비해 높은 함량을 나타내었지만 개다래와 개다래 박의 총 플라보노이드와 총 폴리페놀 함량 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

[0059] 따라서 초임계 추출에 의해 제조한 개다래 박을 열수 또는 주정추출 할 때 초임계 추출이 개다래의 수율이나 주요 기능성 성분인 플라보노이드 및 폴리페놀의 추출에 어떠한 영향도 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

[0060] 또한, 개다래와 개다래 박의 열수 및 주정추출물을 1% 농도로 조정한 후 10명의 훈련된 관능검사원을 대상으로 추출액에 대한 향미묘사시험을 통해 관능적 특성을 도출하였고, 관능적 특성의 강도에 대해 관능검사를 실시하였으며, 그 결과를 표 8에 나타내었다. 또한 추출액에 대한 관능적 기호도를 측정하기 위하여 평가항목으로 색, 향, 맛, 바디감, 종합적 기호도에 대하여 9점 기호척도법(1점: 매우 싫어한다, 9점: 매우 좋아한다)으로 관능검사를 실시하였고, 그 결과를 표 9에 나타내었다.

표 8

[0061]

	개다래		개다래 박	
	열수추출물	주정추출물	열수추출물	주정추출물
쓴맛	6.0±0.9	8.7±0.5	5.2±1.3	8.1±0.8
떫은맛	4.9±0.8	7.4±0.9	4.7±1.2	7.3±1.0
단맛	3.3±1.6	2.4±1.5	3.3±2.0	2.6±1.5
구수한맛	4.2±1.2	3.4±1.0	3.9±1.8	2.9±1.3
한약재향	5.4±1.1	5.9±1.7	4.6±0.9	5.2±1.8

흙냄새	5.0±1.4	5.1±1.8	4.2±1.5	4.5±1.2
박하향	2.7±1.4	4.3±1.2	2.6±0.7	3.6±1.1

[0062] 표 8에 나타난 바와 같이, 향미묘사시험을 통하여 쓴맛, 떫은맛, 단맛, 구수한 맛 등의 맛 특성과 한약재향, 흙냄새, 박하향 등의 향기 특성 등 총 7가지의 관능적 특성을 도출하였으며, 이 중 쓴맛, 떫은맛, 한약재향 등의 강도가 강한 것으로 또한 주정추출물이 열수추출물에 비해 맛과 향기특성이 강한 것으로 확인되었다. 그리고 초임계 추출에 의해 제조한 개다래 박의 경우 개다래에 비해 열수추출물과 주정추출물 모두 대부분의 특성이 상당히 감소하는 것으로 나타났다.

표 9

[0063]

	개다래		개다래 박	
	열수추출물	주정추출물	열수추출물	주정추출물
색	6.7±0.5	4.2±1.0	6.7±0.9	4.3±1.7
향	5.8±0.8	5.3±2.0	6.4±1.3	5.9±1.5
맛	5.7±1.0	3.2±1.0	6.2±1.7	3.9±0.8
바디감	5.6±0.5	4.0±1.5	5.6±1.6	4.3±1.3
종합적 기호도	5.8±1.1	3.5±1.1	6.3±1.1	4.4±1.1

[0064] 표 9에 나타난 바와 같이, 개다래와 개다래 박의 열수 및 주정추출물에 대한 관능적 기호도를 측정하기 위하여 평가항목으로 색, 향, 맛, 바디감, 종합적 기호도에 대하여 9점 기호척도법으로 관능검사를 실시한 결과, 개다래 및 개다래 박 모두 주정추출물에 비해서는 열수추출물의 기호도가 모든 항목에서 높은 기호도를 나타내었고, 개다래 보다는 개다래 박의 추출물의 기호도가 높은 것으로 나타났다.

[0065] **<실시예 3> 개다래 박의 주정추출물의 제조**

[0066] 실시예 1의 45℃, 4500 psi, 1시간 조건에서 회수한 개다래 박 1 kg을 실온에서 24시간 동안 10배량(w/v)의 80% 에탄올(식용주정)에 침지시켜 2회 반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No.3, England)를 사용하여 2회 여과하고, 상등액은 rotary vacuum evaporator (EYELA UNI TRAP UT-1000, JAPAN)로 55℃에서 농축한 후 동결건조하여 개다래 추출물 190 g을 수득하였다.

[0067] **<비교예 2> 개다래 주정 추출물 제조**

[0068] 건조 상태의 개다래 열매 1 kg을 구입하여 가볍게 수세하고, 건조시켰다. 실온에서 24시간 동안 개다래 열매(1 kg)를 10배량(w/v)의 70% 에탄올(식용주정)에 침지시켜 총 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No.3, England)를 사용하여 2회 여과하고, 상등액은 rotary vacuum evaporator (EYELA UNI TRAP UT-1000, JAPAN)로 55℃에서 농축한 후 동결 건조하여 개다래 추출물 306.9 g을 수득하였다.

[0069] **<실험예 3> 추출물의 항염증 효과**

[0070] **1. 세포주 배양**

[0071] 대식세포 계열 (murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포주는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/ streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO_2가 존재하는 37℃ incubator에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다.

[0072] **2. 세포독성 측정 및 Nitric oxide (NO) 생성량 측정**

[0073] 실시예 3에서 추출한 개다래 박 주정 추출물 및 비교예 2에서 추출한 개다래 주정 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하여 측정하였다. RAW 264.7 세포 1× 10^5 cells/well을 96 well plate에 분주하고, 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 serum free 배지로 교체한 후 LPS (100 ng/mL)와 시료를 각각 처리하여 24시간 배양하여 5 mg/mL의 MTT 용액 10 μL를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate

reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

[0074] 시료의 NO생성 억제능을 측정하기 위하여, 각 시료의 추출물과 LPS를 처리한 배양액을 nitrite 측정을 위해 100 μL를 96 well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite ($NaNO_2$)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였고, 산출값은 3회 반복한 실험 data의 mean ± SEM 값으로 나타내었다.

[0075] 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(proinflammatory mediators)이 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E_2 (PGE_2) 등이 있다. 이러한 염증 인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor-kB (NF-kB)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE_2를 생성하여 염증을 일으킨다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)인 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) 등이 포함된다.

표 10

[0076]

Sample	Concentration (μg/mL)	Cell survival rate (%)	NO inhibition rate (%)*
EtOH ext.	10	95.32 ± 5.06	4.61 ± 0.91
	100	102.73 ± 0.28	19.00 ± 2.34
Marc ext.	10	96.18 ± 4.23	36.63 ± 4.00
	100	98.17 ± 1.71	70.58 ± 3.35

[0077] 표 10에 나타난 바와 같이, 활성질소종(reactive nitrogen species)의 하나이며, 염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 NO에 대한 개다래 주정 추출물(EtOH ext.) 및 개다래 박 주정 추출물(Marc ext.)의 소거효과를 관찰한 결과, 대조구에서 LPS 유도에 의한 NO 생성량이 약 45 μM이었다. 이에 비해 각 추출물을 10, 100 μg/mL을 처리하였을 때, 개다래 주정 추출물(EtOH ext.)의 NO 생성량은 각각 42.93, 36.45 μM을 나타내 NO 소거활성이 미미한 편이었으나, 개다래 박 주정 추출물(Marc ext.)의 경우, 각각 28.97, 13.45 μM을 나타내 각 농도에서 약 36% 및 70%의 우수한 NO 소거활성을 보였다. 따라서 개다래는 주정 추출물에 비해 초임계 추출물의 박 추출물이 우수한 NO 소거능을 가지는 것으로 나타났다. 또한 이들 농도에서 95% 이상의 세포 생존율을 보여 개다래 추출물의 항염증 효과는 세포 생존율의 감소와는 관계없음을 확인하였다.

[0078] **3. PGE_2 및 TNF-α 생성량 측정**

[0079] 세포 배양액 내의 PGE_2 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 Cayman chemical (Michigan, USA)에서 구입하여 실험하였다. 실시예 3에서 추출한 개다래 박 주정 추출물과 LPS(100ng/mL)를 처리한 배양액을 이용하여 PGE_2 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 50 μL씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution 50 μL와 PGE_2 conjugate 50 μL씩 첨가하여 4℃에서 overnight시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200 μL씩 처리하여 5-60분간 반응시킨 후, 50 μL의 stop solution을 처리한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Liked Immunosorbent Assay (ELISA)를 수행하였다. 또한, 실시예 2에서 추출한 개다래 박 주정 추출물과 LPS(100ng/mL)를 처리한 배양액을 이용하여 TNF-α 측정에 사용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50 μL씩 첨가하여 4℃에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척한 다음, 100 μL의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에 di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate (TMB) substrate를 100 μL씩 처리하여 5-30분간 반응시킨 후 100 μL의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0080] 개다래 박 주정 추출물이 PGE_2와 TNF-α의 생성량에 미치는 영향을 측정한 결과, RAW 264.7 세포에 100 ng/mL의 LPS를 처리했을 때, PGE_2의 생성량은 약 20배 증가되었다. 개다래 박 추출물을 각각 10, 100 μg/mL로 처리했을 때, PGE_2 함량은 약 740, 500 pg/mL의 농도를 보여 개다래 박 추출물이 90% 이상의 PGE_2 생성 억제를 보였다.

또한 LPS 처리시에 TNF-α는 효과적으로 유도되었으며, 개다래 박 추출물을 처리했을 때, 10 μg/mL의 농도에서는 별다른 영향을 미치지 못했으나, 100 μg/mL의 농도에서 TNF-α의 생성을 약 50% 이상 감소시켰다(도 1 및 도 2).

[0081] 염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, PGE_2, lysosomal enzyme, free radical 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다. RAW 264.7 세포주에 개다래 박 추출물을 처리하고, LPS를 처리하여 염증을 유발한 후 염증인자인 NO, PGE_2의 생성, 그리고 proinflammatory cytokines인 TNF-α의 생성량을 측정한 결과, 개다래 박 추출물은 LPS로 유도된 염증 인자들을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타나 동맥경화를 비롯한 고혈압, 암, 당뇨, 관절염 등의 만성 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

[0082] **<실험예 4> 추출물의 항알러지 효과**

[0083] **1. 세포배양 및 세포독성 측정**

[0084] Rat 유래의 비만세포(RBL-2H3)에 대한 세포독성능 측정은 MTT 법으로 실험하였다. 본 실험에 사용한 세포주 RBL-2H3 cell은 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)을 통해서 분양 받아 계대배양하면서 실험하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37℃에서 5% CO_2 incubator에서 2~3일간 배양한 후 사용하였다. 실시예 3에서 추출한 개다래 박 주정 추출물 및 비교예 2에서 추출한 개다래 주정 추출물을 IgE와 antigen으로 활성화시킨 세포에 12시간 처리하여 시료의 세포독성을 측정한 결과, 10-400 ㎍/mL의 농도 구간에서 비만세포주에 독성을 나타내지 않았다(도 3).

[0085] **2. 비만세포 보호 효과**

[0086] 알레르기 반응은 크게 4가지 유형(I-IV)으로 나뉘며, 아토피성 피부염, 알레르기성 비염 및 기관지천식 등의 알레르기 질환들은 제I형 알레르기 반응에 속한다. 비만세포는 이러한 제I형 알레르기 반응에 중요한 역할을 하며 피부, 호흡기, 혈관 주위, 뇌 등 생체내 결합조직에 널리 분포되어 있다. 이러한 비만 세포가 면약학적 또는 비면역학적으로 활성화되면 탈과립이 유도되고, 세포내 과립에 저장되어 있던 히스타민 등이 유리되어 알레르기 증상들이 나타난다. 비만세포주인 RBL-2H3 세포에서 항원의 자극에 의한 탈과립 시 히스타민과 함께 방출되어 탈과립의 지표물질로 널리 이용되는 β-hexosaminidase의 활성을 측정하여 시료의 탈과립 억제능을 측정하였다.

[0087] **2-1. β-Hexosaminidase 방출 억제능 측정**

[0088] 비만세포주 RBL-2H3을 1 ml (2×10^5 cells, 24 well plate)에 anti-DNP IgE (0.45 ㎍/ml)로 16시간 감작시키고, DNP-BSA(10 ㎍/mL)로 활성화시키기 전에 30분 동안 37℃에서 농도별 시료를 20 ml 처리하였다. 반응이 끝난 후 4℃에서 10분간 400xg에서 원침하여 얻은 상등액 25 ㎕를 기질 p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide 25 ㎕와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 stop solution(0.1 M NaCO/NaHCO, pH 10) 200 ㎕를 가하여 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 b-hexosaminidase의 양을 계산하였다.

[0089] 도 4에 나타난 바와 같이 비교예 2에서 추출한 개다래 주정추출물 0.01, 0.1, 0.4 mg/mL의 농도로 처리된 세포에서 유리되는 β-hexosaminidase의 활성은 대조군에 비해 각각 87.9%, 45.6%, 27.4%를 나타내며, 실시예 3에서 추출한 개다래 박의 주정추출물의 경우, 73.2%, 54.3%, 42.5%를 나타내어 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

[0090] **2-2. Compound 48/80에 의한 탈과립에 대한 보호효과**

[0091] 실시예 3에서 추출한 개다래 박 주정 추출물 및 비교예 2에서 추출한 개다래 주정 추출물의 탈과립 억제효과를 비만세포의 형태변화 관찰로 확인하기 위하여, RBL-2H3을 1 mL (2×10^5 cells, 24 well plate)에 4시간 배양한 후, 1 mM Ca^{2+}을 함유하는 200 ㎕ incubation buffer에서 10분간 incubation 한 후, 0.1% DMSO 용액이나 농도별 시료 25 ㎕를 각각 넣어 37℃에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, compound 48/80 용액 25 ㎕를 첨가하여 20, 40분간 반응시켰다. 반응 후, 광학현미경상으로 비만세포주의 형태를 600배의 배율하에서 세포를 도립현미경(LEICA DMIRE2, Germany)으로 관찰하였다. 200배의 배율하에서 전체적인 탈과립 정도를 확인하였으며, 3회 실험으로 재현성을 확인하였다. 정상 비만세포주의 형태는 원형 또는 난원형으로 세포 윤곽이 뚜렷하고, 매끄러운 표면을 갖는 반면, compound 48/80 처리로 활성화되어 탈과립이 일어난 세포의 형태는 세포 윤곽이 불분명하고

크기가 적으며, 세포질내 과립들이 돌출되거나 세포주위에 흩어져 있는 것을 볼 수 있었다(도 5). Compound 48/80으로 처리하지 않고 시료만 처리한 경우, 탈과립은 일어나지 않아 세포의 형태는 변화가 없었으며, 개다래 주정과 박 추출물 모두 400 ㎍/mL의 농도에서 세포를 탈과립으로부터 보호하는 효과를 관찰할 수 있었으며, 200 ㎍/mL의 농도에서는 20분 처리시에는 보호효과가 있었으나(Data not shown), 40분 후에는 보호효과가 대부분 사라지는 것을 확인하였다(도 5).

[0092] **3. TNF-a 생성 억제능 측정**

[0093] RBL-2H3 세포를 24-well plate (2 × 10^5 cells/well)에 분주한 후 12시간 배양하였다. 새로운 MEM 배지에 실시예 3에서 추출한 개다래 박 주정 추출물 및 비교예 2에서 추출한 "개다래 주정 추출물을 농도별(0.01, 0.1, 0.4mg/mL)로 처리하고, A23187 (1 μM)과 PMA (50 ng/mL)를 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 이때 대조구로 Luteolin(5 μM)를 사용하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 분리하여 -70℃에 보관 후 TNF-α ELISA kit를 사용하여 측정하였다. ELISA reader를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 TNF-α의 양을 계산하였다. Proinflammatory 인자인 TNF-α의 생성에 대한 시료의 억제효과를 측정한 결과, TNF-α는 세포 활성화 전 5.06 pg/mL에서 활성화로 인해 87.14 pg/mL로 현저히 증가하였으나, 0.1 mg/mL의 주정추출물과 박추출물을 처리한 경우, 69.1pg/mL, 68.6pg/mL로, 비슷하게 TNF-a 생성 억제효과가 있음을 확인하였다(도 6).

[0094] **<제조예 1> 음료의 제조**

[0095] 실시예 2에서 제조된 개다래 박 주정 추출물 분말 20중량%, 비타민B1 염산염 0.00075중량%, 비타민B2 인산에스테르나트륨 0.00075중량%, 비타민B6 염산염 0.00045중량%, 엽산 0.00005중량%, 니코틴산아미드 0.003중량%, 구연산 0.095중량%, 당류 25.3중량% 및 정제수 54.6중량%를 혼합하여 여과시킨 후, 여과된 혼합물을 90℃ 이상에서 20초간 살균하여 충전한 후 85℃에서 30분간 살균하여 음료를 제조하였다.

[0096] **<제조예 2> 정제의 제조**

[0097] 실시예 2에서 제조된 개다래 박 주정 추출물 분말 40mg, 유당 100mg, 전분 100mg을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0098] **<제조예 3> 과립제의 제조**

[0099] 실시예 2에서 제조된 개다래 박 주정 추출물 분말 35중량%, 비타민C 0.3중량%, 포도당 28중량%, 덱스트린 28중량%, 70% 에탄올 8.7중량%를 함께 반죽하고 과립제조기를 통과시켜 과립 60mesh의 과립을 제조하였다.

[0100] **<제조예 4> 캡슐제의 제조**

[0101] 실시예 2에서 제조된 개다래 박 주정 추출물 분말 20mg, 유당 50mg, 전분 50mg, 탈크 2mg을 혼합하고, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충진하여 캡슐제를 제조하였다.

[0102] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0103] 도 1은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 대한 개다래 박 주정 추출물의 PGE_2 생성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다(3회 반복한 실험 data의 mean ± SEM 값, *p<0.05).

[0104] 도 2는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 대한 개다래 박 주정 추출물의 TNF-α 생성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다(3회 반복한 실험 data의 mean ± SEM 값, *p<0.05).

[0105] 도 3은 IgE와 antigen으로 활성화시킨 RBL-2H3 세포에 대한 개다래 주정 추출물 및 개다래 박 주정 추출물의 세포독성을 측정한 그래프이다(A: 개다래 주정 추출물, B: 개다래 박 주정 추출물).

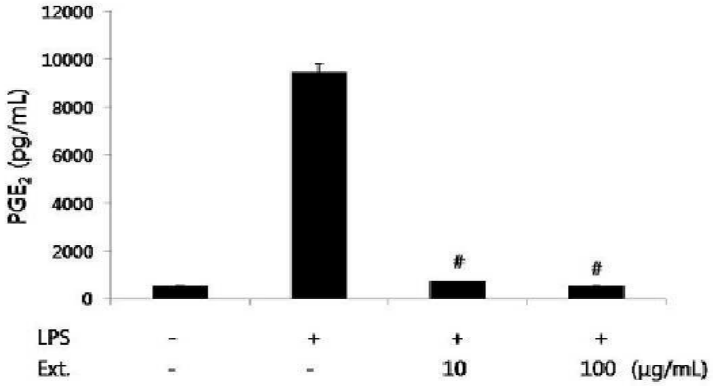
[0106] 도 4는 IgE와 DNP-BSA로 활성화시킨 RBL-2H3 세포에 대한 개다래 주정 추출물 및 개다래 박 주정 추출물의 β-hexosaminidase의 방출 억제능을 측정한 그래프이다(A: 개다래 주정 추출물, B: 개다래 박 주정 추출물).

[0107] 도 5는 compound 48/80 용액으로 처리된 비만세포주에 대한 개다래 주정 추출물 및 개다래 박 주정 추출물의 탈과립 보호능을 도립현미경(x 600)으로 관찰한 사진이다(A: 개다래 주정 추출물, B: 개다래 박 주정 추출물, 1,2,3: compound 48/80 처리전, 4,5,6: compound 48/80 처리후, 4: 무처리 5: 400 ㎍/mL, 6: 200 ㎍/mL).

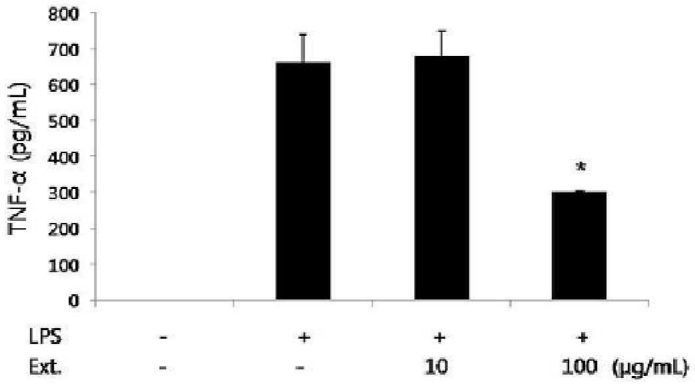
[0108] 도 6은 A23187 (1 μM)과 PMA (50 ng/mL)으로 자극된 RBL-2H3 세포에 대한 개다래 주정 추출물 및 개다래 박 주정 추출물의 TNF-α 생성 억제능을 측정한 그래프이다(A: 개다래 주정 추출물, B: 개다래 박 주정 추출물).

도면

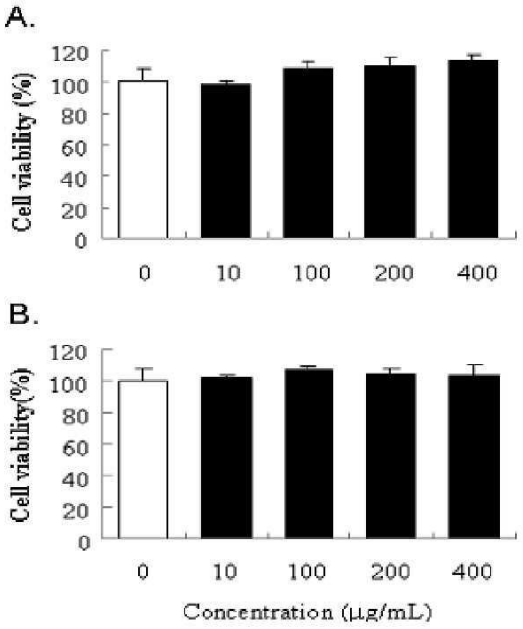
도면1



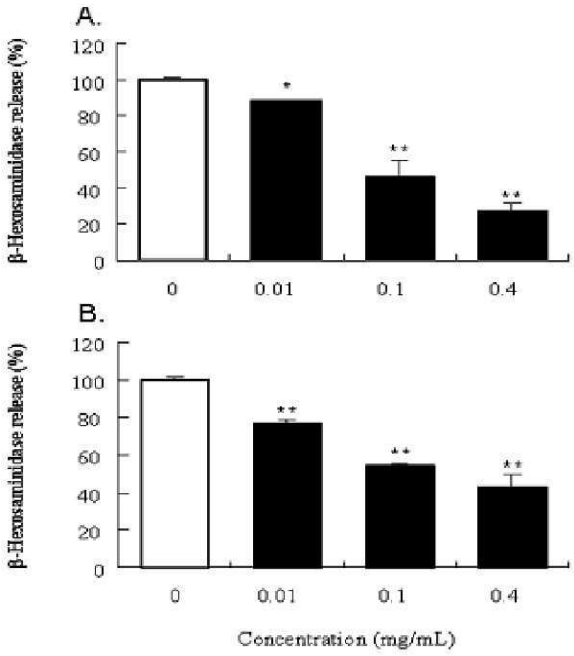
도면2



도면3

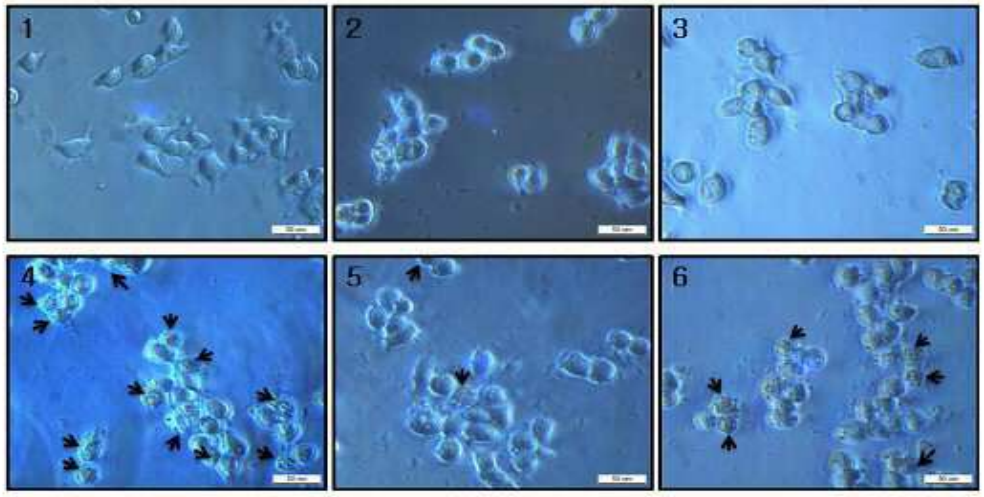

A.
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
100
200
400
B.
Cell viability(%)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
100
200
400
Concentration (μg/mL)

도면4

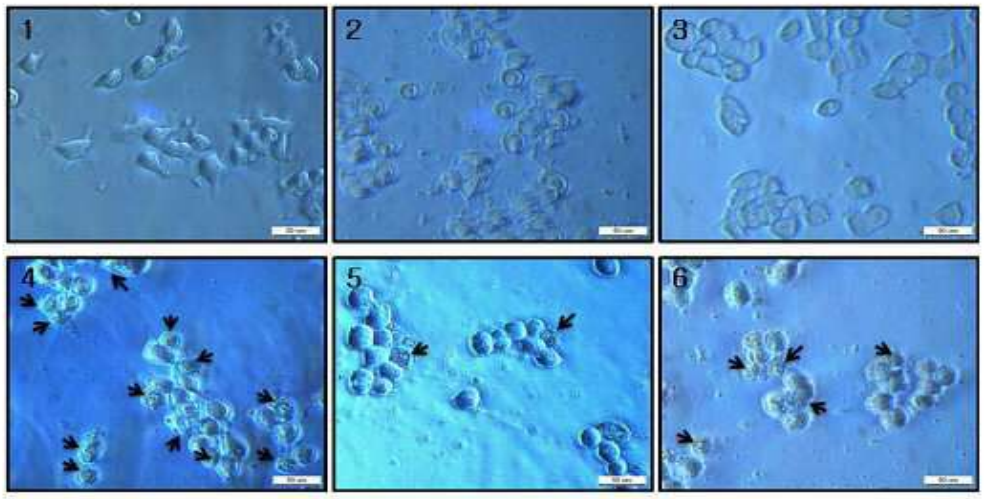

A.
β-Hexosaminidase release (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
**
**
0
0.01
0.1
0.4
B.
β-Hexosaminidase release (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
0
0.01
0.1
0.4
Concentration (mg/mL)

도면5

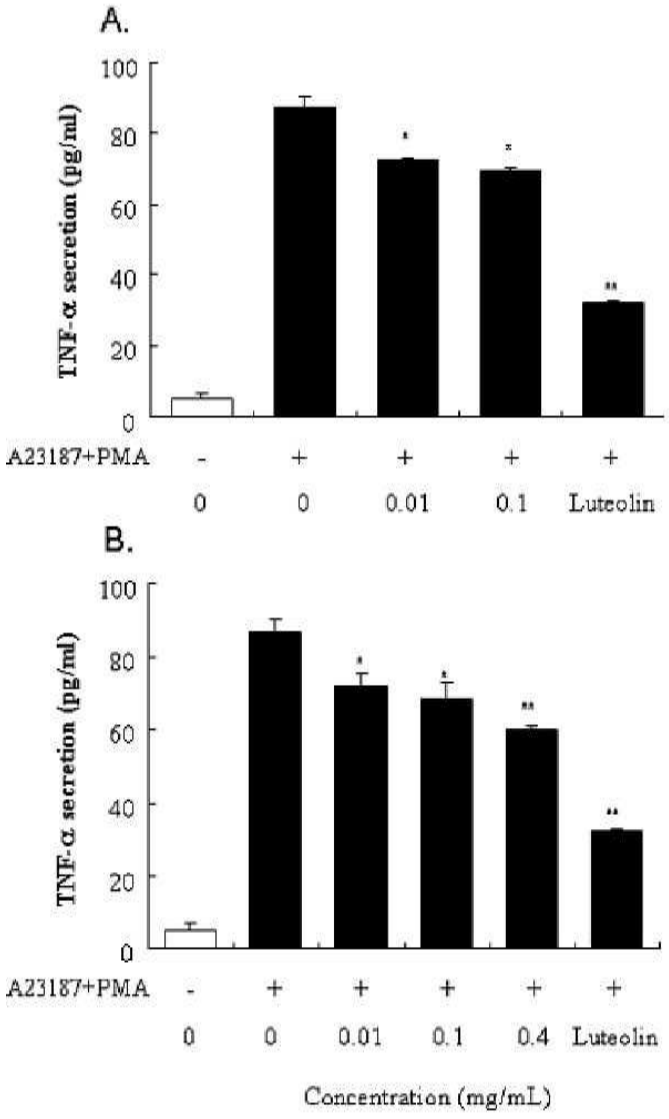
A.



B.



도면6


A.
TNF-α secretion (pg/ml)
100
80
60
40
20
0
A23187+PMA - + + + +
0 0 0.01 0.1 Luteolin
B.
TNF-α secretion (pg/ml)
100
80
60
40
20
0
A23187+PMA - + + + + +
0 0 0.01 0.1 0.4 Luteolin
Concentration (mg/mL)