

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 12월 2일 (02.12.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/137875 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/484 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003335
- (22) 국제출원일: 2010년 5월 26일 (26.05.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0046107 2009년 5월 26일 (26.05.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여):
(주)아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION) [KR/KR]; 서울특별시 용산구 한강로 2가 181,
140-777 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 신현정 (SHIN, Hyun Jung) [KR/KR]; 서울특별시 금천구 독산 4동 200-14,
153-809 Seoul (KR). 김진관 (KIM, Jin Kwan) [KR/KR]; 경기도 수원시 권선구 오목천동 951 대우푸

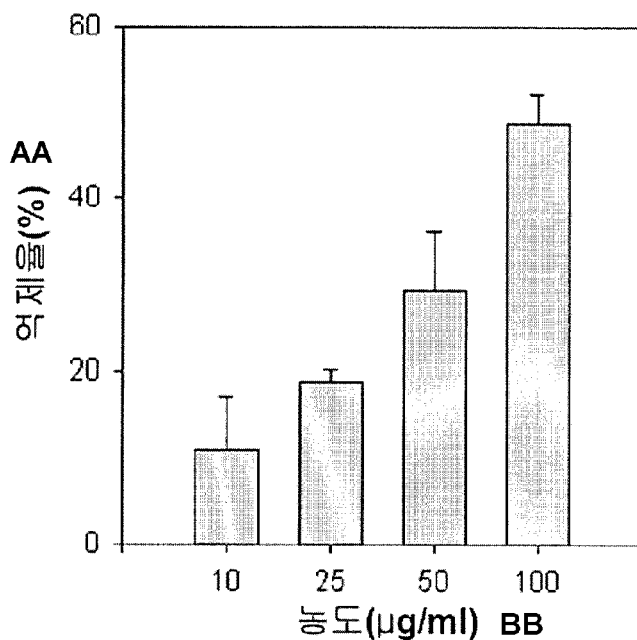
르지오아파트 102 동 606 호, 441-765 Gyeonggi-do (KR). 김채욱 (KIM, Chae Wook) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보라동 현대모닝사이드 2 차아파트 101 동 1703 호, 446-583 Gyeonggi-do (KR). 주경미 (JOO, Kyung Mi) [KR/KR]; 경기도 화성시 반송동 시범다운 마을포스코더샵아파트 320 동 1205 호, 445-724 Gyeonggi-do (KR). 정연수 (JEONG, Yeon Su) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1, 446-904 Gyeonggi-do (KR). 임경민 (LIM, Kyung Min) [KR/KR]; 경기도 화성시 반송동 시범다운마을포스코 더샵아파트 320 동 1205 호, 445-724 Gyeonggi-do (KR). 서대방 (SEO, Dae-Bang) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 상갈동 금화마을주공 3 단지아파트 306 동 1701 호, 446-760 Gyeonggi-do (KR). 주영협 (JOO, Yung Hyup) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 중동 백현마을동일하이빌아파트 2108 동 1901 호, 446-753 Gyeonggi-do (KR). 이상준 (LEE, Sang Jun) [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 정자동 한솔마을 LG 아파트 205 동 702 호, 463-909 Gyeonggi-do (KR). 박영호 (PARK, Young-Ho) [KR/KR]; 서울특별시 동작구 사당 3 동 대림아파트 3 동 1201 호, 156-775 Seoul (KR).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING A BEAN EXTRACT FOR IMPROVING BLOOD CIRCULATION AND INCREASING VASCULAR HEALTH

(54) 발명의 명칭 : 콩 추출물을 함유하는 혈액 순환 개선 및 혈관 건강 증진용 조성물

[Fig. 1]



AA ... Suppression rate (%)
BB ... Concentration (μg/ml)

(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing a bean extract extracted by low-concentration, low-grade alcohol or fractions thereof. The composition exhibits excellent effects in improving blood circulation, improving obesity, and preventing diabetes, hyperlipidemia and the like, and exhibits the effects of alleviating or treating the symptoms of diabetes, hyperlipidemia, and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 저농도 저급 알코올로 추출한 콩 추출물 또는 그 분획물을 함유하는 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 혈액 순환 개선 효과가 우수하고, 비만 상태를 개선시키며, 당뇨 및 고지혈증 등의 예방, 증상의 완화 또는 치료에 효과적이다.



(74) **대리인: 김순영 (KIM, Sun-young)**; 서울특별시 종로구 수송동 80-6 석탄회관빌딩 10층, 110-727 Seoul (KR).

(81) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 콩 추출물을 함유하는 혈액 순환 개선 및 혈관 건강 증진용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 콩 추출물을 함유하는 혈액 순환 개선 및 혈관 건강 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 식생활 패턴의 변화에 따라, 현대인은 지방질 섭취량은 많아짐에도 운동량은 상대적으로 부족하며, 각종 스트레스를 받으며 살아가고 있다. 이러한 식생활의 변화로 인해, 고혈압, 동맥경화 또는 혈액순환 장애 등의 질병이 증가하는 추세이다. 특히, 혈액순환 장애는 기억력 감퇴, 무기력, 집중력의 약화 및 만성 피로 등의 증상을 유발하는 것으로 알려져 있다.
- [3] 혈액순환이란 체내의 혈액이 일정한 방향으로 유동하는 현상을 말하고, 혈액순환 장애는 혈관이 탄력을 잃고 내벽에 콜레스테롤 등이 침착되어 혈관 내부가 좁아져 혈액순환이 원활이 이루어지지 않는 현상을 의미한다.
- [4] 혈액순환 장애로 인해 유발되는 질병으로는, 고지혈증, 동맥경화, 심근경색 또는 뇌혈전증 등과 같은 심혈관계 질환이 있다. 심혈관계 질병 중에서도 고혈압, 동맥경화, 심장병 또는 뇌졸중 등은 노령층에서는 사망의 가장 큰 원인 중 하나로 꼽히고 있다.
- [5] 이처럼 혈액순환 장애를 방지할 경우에는 정상적인 생활을 유지하는 데에 어려움을 주게 되고, 심할 경우에는 다양한 형태의 질환으로 발전되어 사망에 이를 수도 있다. 따라서, 혈액순환 장애로 인한 질병에 대한 치료보다는 예방이 중요하다고 볼 수 있다. 또한, 현재 임상에서는 심혈관계 질병에 대한 의약품이 사용되고 있으나, 이러한 의약품의 경우에는 다양한 형태의 부작용이 우려되며, 비용이 비싸다는 문제점 등이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 일실시예의 목적은 혈액 순환 개선을 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 혈관 건강 증진을 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 혈액 순환 개선을 위한 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 혈관 건강 증진을 위한 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 혈액 순환 개선을 위한 건강식품

조성물을 제공하는 것이다.

- [11] 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 혈관 건강 증진을 위한 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명의 일실시예에 따른 조성물은 저농도의 저급 알코올을 이용한 콩 추출물 또는 그 분획물을 유효성분으로 함유한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명에 따른 조성물은 혈액 순환 개선 효과가 우수하고, 비만, 당뇨 및 고지혈증 등의 혈관 질환의 예방, 증상의 완화 또는 치료에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 서리태 추출물의 농도에 따른 혈소판 응집 억제 효능을 나타낸 그래프이다;
- [15] 도 2는 서리태 추출물을 경구 투여시 혈전 생성 억제 효능을 나타낸 그래프이다;
- [16] 도 3은 서리태 추출물을 장기간 경구 투여시 혈전 생성 억제 효능을 나타낸 그래프이다;
- [17] 도 4는 서리태 추출물에 대한 에틸아세테이트 분획의 농도에 따른 혈소판 응집 억제 효능을 나타낸 그래프이다;
- [18] 도 5는 서리태의 에탄올 추출물에 대한 에틸아세테이트 분획물을 경구 투여시 혈전 생성 억제 효능을 나타낸 그래프이다;
- [19] 도 6은 서리태 추출물의 에틸아세테이트 분획에 대한 분리 정제 과정을 나타낸 모식도이다;
- [20] 도 7 내지 9는 서리태 추출물의 에틸아세테이트 분획에 대한 분리 단계별 혈소판 응집율을 측정한 결과를 나타낸 그래프들이다;
- [21] 도 10은 서리태 추출물의 에틸아세테이트 분획의 최종 정제 성분과 아테노신의 혈소판 응집율을 농도별로 비교 측정한 결과를 나타낸 그래프이다;
- [22] 도 11은 서리태 추출물의 혈소판 응집율을 농도별로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다;
- [23] 도 12는 아테노신의 혈소판 응집율을 농도별로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다;
- [24] 도 13은 서리태 추출물을 처리한 경우와 그렇지 않은 경우에 대하여 LPA와 PA에 의한 PS 노출 정도를 나타낸 그래프이다;
- [25] 도 14는 서리태 추출물을 처리한 경우와 그렇지 않은 경우에 대하여 LPA와 PA에 의한 MV 생성 정도를 나타낸 그래프이다;
- [26] 도 15는 서리태 추출물을 처리한 경우와 그렇지 않은 경우에 대하여 LPA와 PA에 의한 트롬빈 생성 정도를 나타낸 그래프이다;

- [27] 도 16과 17은 서리태 추출물을 농도별로 처리한 경우에 각각 PT와 aPTT를 측정된 결과를 나타낸 그래프들이다;
- [28] 도 18은 서리태 추출물, 아스피린 및 클로피도그렐을 처리한 경우에 각각의 출혈지속시간을 비교 측정한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 종래의 콩에 관한 연구는, 콩에서 약리활성을 나타내는 유효성분을 분리, 정제하는 방향으로 진행되었으며, 콩 자체의 의약적 용도에 대한 연구는 부족하였다. 또한 그 추출방법에 있어서도, 천연물에서 통상적으로 이용하는 추출법인, 고농도의 유기 용매를 이용한 추출방법을 사용하였다.
- [30] 콩 추출물에는 밝혀진 성분 외에 아직도 여러 가지 미지의 성분들이 있으며, 이들 중 일부 성분은 인체에 유용한 약리효과를 나타내기도 한다. 본 발명의 발명자들은 천연물 및 생약 추출에서 일반적으로 사용되는 추출법에 대한 인식을 탈피하여, 저농도의 저급 알코올을 추출 용매로 사용하여 콩으로부터 추출물을 획득하였고, 이 추출물이 고농도 유기 용매를 추출 용매로 사용하는 경우보다 더 강력한 항혈전 효능이 있음을 밝혀냈다.
- [31] 본 발명의 일실시예에 따른 조성물은, 저농도의 유기용매를 이용하여 추출한 콩 추출물 또는 추출된 콩 추출물의 분획물을 함유하는 것을 특징으로 한다. 일실시예에서, 상기 유기 용매는, 특별히 제한되는 것은 아니며, $C_1 \sim C_5$ 알코올일 수 있다. 상기 $C_1 \sim C_5$ 알코올은, 예를 들어, 메탄올, 에탄올, 이소프로필알코올, n-프로필알코올, n-부탄올 및 이소부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합용매일 수 있으며, 구체적으로는 에탄올이다. 또 다른 일실시예에서, 상기 $C_1 \sim C_5$ 알코올의 농도는 1 내지 70%(v/v), 또는 1 내지 40%(v/v)이며, 구체적으로는 5 내지 25%(v/v), 보다 구체적으로는 7 내지 20%(v/v)이다. 예를 들어, 상기 용매는 10 또는 20%(v/v) 에탄올이다.
- [32] 본 발명에 따른 조성물은, 저농도의 저급 알코올을 이용하여 콩을 추출하게 된다. 본 발명의 발명자들은, 다양한 연구 및 반복적인 실험을 통해, 여러 종류의 유기용매들 중에서 저급 알코올, 예를 들어 에탄올, 특히 저농도 에탄올을 이용하여 추출한 콩 추출물이 혈액 순환을 개선시키고, 이를 통해 혈관 건강을 증진시키며, 비만 및 당뇨에 효과적이며, 고지혈증에 우수한 효과를 갖는다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [33] 상기 콩 추출물의 분획물은 콩 추출물에 대한 추가적인 분획 공정을 거쳐 분리된 성분을 의미한다. 일실시예에서, 콩 추출물의 분획물은 $C_1 \sim C_5$ 알코올 추출물에 대한 에틸아세테이트 또는 부탄올 분획물이며, 구체적으로는 에틸아세테이트 분획물일 수 있다. 본 발명의 발명자들은 저농도 에탄올을 이용하여 추출한 콩 추출물에 대한 다양한 분획을 추출하는 실험을 진행하였다. 실험 결과, 에틸아세테이트 또는 부탄올 분획물이 물 분획물에 비해 혈액 순환 개선 효능이 우수한 것으로 확인되었으며, 특히 에틸아세테이트 분획물의

효능이 매우 우수한 것으로 나타났다.

[34] 본 발명에 따른 콩 추출물 또는 그 분획물을 함유하는 조성물은, 혈소판 응집을 억제하여 혈전생성을 저해하는 효능이 있으며, 혈관의 수축을 억제하여 혈관 이완을 유도하는 효능이 있다. 또한, 콜레스테롤의 증가를 억제하여 혈액과 간의 지질을 감소시키는 효능이 인정된다. 따라서, 이러한 효능을 통해, 혈액 순환 개선에 효과적이며, 혈관 건강을 증진시킬 뿐만 아니라, 비만, 당뇨 및 고지혈증 등의 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다.

[35] 일실시에에서, 상기 콩 추출물 또는 그 분획물은 지표성분 또는 기능성분으로 아데노신(adenosine)을 함유할 수 있다. 본 발명의 발명자들은 콩 추출물 또는 그 분획물에 대한 분리 정제 실험을 실시하였다. 분리 정제된 물질의 활성을 측정한 결과, 아데노신과 동일한 물질이 함유되어 있음을 규명하였다. 일실시에에서, 아데노신의 함량은, 콩 추출물 또는 그 분획물 중량을 기준으로, 0.01 내지 1.0 중량%, 보다 구체적으로는 0.1 내지 0.6 중량%일 수 있다. 이를 통해, 본 발명에 따른 저농도의 저급 알코올을 이용한 콩 추출물에는 아데노신과 같은 유효성분이 상대적으로 높은 함량으로 함유되어 있음을 알 수 있다.

[36]

[37] 본 발명에 따른 콩은, 콩의 추출물 또는 그 분획물이 혈액순환 개선 효능을 갖는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 일실시에에서, 상기 콩은 검은콩 또는 유색콩을 포함한다. 또 다른 일실시에에서, 상기 콩은 서리태, 서목태, 흑태, 청태, 황태, 울타리콩, 강낭콩, 얼룩강낭콩, 적두, 거두, 콩나물콩 및 대두로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 보다 구체적으로는 상기 콩은 서리태 또는 울타리콩일 수 있다.

[38] 본 발명에 따른 “검은콩(black bean)”이란, 낱알 껍질의 색이 검은 빛깔을 띠는 콩을 총칭하는 의미이다. 상기 검은콩의 예로는, 특별히 제한되는 것은 아니며, 예를 들어, 검정콩, 서리태, 서목태 및 흑태 등이 있다. 검은콩의 명칭은 지역이나 분류, 방언의 영향 등으로 다양하게 호칭될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 “검은콩 추출물”이란, 검은콩에 대한 다양한 추출과정을 통해 추출된 물질을 총칭하며, 예를 들어, 유기 용매 등을 이용하여 추출된 물질을 포함하고, 추출된 물질에 대한 다양한 분획물 등을 포함하는 의미이다.

[39] 또한, 본 발명에 따른 “유색콩(colored-bean)”이란, 낱알 껍질의 색이 짙은 빛깔을 띠는 콩을 총칭하는 의미이며, 검은색 뿐만 아니라 적색, 황색 또는 청색 등의 빛깔이 나는 경우도 포괄한다. 상기 유색콩의 예로는, 특별히 제한되는 것은 아니며, 예를 들어, 서리태, 서목태, 흑태, 청태, 황태, 울타리콩, 강낭콩, 얼룩강낭콩, 적두, 거두, 콩나물콩 및 대두 등이 있다. 유색콩의 명칭은 지역이나 분류, 방언의 영향 등으로 다양하게 호칭될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 “유색콩 추출물”이란, 유색콩에 대한 다양한 추출과정을 통해 추출된 물질을 총칭하며, 예를 들어, 유기 용매 등을 이용하여 추출된 물질을 포함하며, 또한 추출된 물질에 대한 다양한 분획물 등을 포함하는 의미이다.

[40]

[41] 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일실시예에서, 상기 약학 조성물은 혈액 순환 개선용일 수 있으며, 혈관 질환의 예방, 증상의 경감 또는 치료에 효과적인 약학 조성물일 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 혈전생성 방지, 혈관수축 억제 및/또는 콜레스테롤 억제 효능이 인정된다. 구체적으로는, 상기 약학 조성물은, 항혈전 효능에 기인하는 혈액 순환 개선용일 수 있으며, 비만, 당뇨 및 고지혈증 등을 포함하는 혈관 질환의 예방, 증상의 완화 또는 치료에 효과적인 약학 조성물일 수 있다. 상기 혈관 질환은, 예를 들어, 비만, 당뇨, 뇌졸중, 뇌출혈, 동맥경화, 협심증, 심근경색, 고혈압, 빈혈, 편두통 또는 고지혈증 등을 포함한다.

[42] 본 발명에 따른 조성물을 의약품에 적용할 경우에는, 상기 조성물을 유효성분으로 하여 상용되는 무기 또는 유기 담체를 가하여 고체, 반고체 또는 액상의 형태로 경구 투여제 혹은 비경구 투여제로 제제화 할 수 있다.

[43] 상기 경구 투여를 위한 제제로서는 정제 (錠劑), 환제 (丸劑), 과립제 (顆粒劑), 연·경 캡슐제, 산제, 세립제, 분제, 유탁제 (乳濁濟), 시럽제, 펠렛제 등을 들 수 있다. 또한, 상기 비경구 투여를 위한 제제로는 주사제, 점적제, 연고, 로션, 스프레이, 현탁제, 유제, 좌제 (坐劑) 등을 들 수 있다. 본 발명의 유효성분을 제제화하기 위해서는 상법에 따라서 실시하면 용이하게 제제화할 수 있으며 계면활성제, 부형제, 착색료, 향신료, 보존료, 안정제, 완충제, 현탁제, 기타 상용하는 보조제를 적당히 사용할 수 있다.

[44] 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 경구, 비경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여될 수 있다.

[45] 또한, 상기 활성성분의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있다. 일반적인 투여량은 0.001 mg/kg/일 내지 2000 mg/kg/일, 보다 구체적으로는 0.5 mg/kg/일 내지 1500 mg/kg/일이다.

[46]

[47] 일실시예에서, 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 건강식품 등을 제공한다. 구체적으로는, 상기 조성물은, 혈액 순환 개선용일 수 있으며, 비만, 당뇨 및 고지혈증을 포함하는 혈관 질환의 예방, 증상의 완화 또는 치료에 효과적인 건강식품 조성물일 수 있다. 상기 혈관 질환은, 예를 들어, 비만, 당뇨, 뇌졸중, 뇌출혈, 동맥경화, 협심증, 심근경색, 고혈압, 빈혈, 편두통 또는 고지혈증 등을 포함한다.

[48] 본 발명에 따른 조성물은 포함하는 다양한 형태의 식품 첨가제 또는 기능성 식품을 제공한다. 상기 조성물을 포함하는 발효유, 치즈, 요구르트, 주스, 생균제제 및 건강보조식품 등으로 가공될 수 있으며, 그 외 다양한 식품 첨가제의 형태로 사용될 수 있다.

[49] 일실시에에서 상기 조성물은, 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 함유할 수 있다. 예를 들어, 물성 개선을 위하여 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 무기염류, 유화제 및 합성 고분자 물질 등의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 그 외에도, 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당 및 해초 엑기스 등의 보조 성분을 더 포함할 수도 있다. 상기 성분들은 제형 또는 사용 목적에 따라서 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 그 첨가량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 성분들의 첨가량은, 조성물 전체 중량을 기준으로, 0.01~5 중량%, 보다 구체적으로는 0.01~3 중량% 범위일 수 있다.

[50] 본 발명에 따른 조성물의 제형은 용액, 유화물, 점성형 혼합물, 타블렛, 분말 등의 다양한 형태일 수 있으며, 이는 단순 음용, 주사 투여, 스프레이 방식 또는 스퀴즈 방식 등의 다양한 방법으로 투여될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[51] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상술하지만, 하기 실시예 등은 본 발명의 효과를 예시적으로 확인하기 위한 것이며, 본 발명의 범주가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[52]

[53] [실시예 1] 10% 에탄올 서리태 추출물의 제조

[54] 건조된 서리태 1 kg을 50°C의 온도에서 10%의 에탄올 용액 10 L에 침지하여 5 시간 동안 3 회 환류 추출한 다음, 상온에서 12 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 7~20%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.

[55]

[56] [실시예 2] 20% 에탄올 서리태 추출물의 제조

[57] 건조된 서리태 1 kg을 50°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 10 L에 침지하여 5 시간 동안 3 회 환류 추출한 다음, 상온에서 12 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 7~20%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.

[58]

[59] [실시예 3] 50% 에탄올 서리태 추출물의 제조

[60] 건조된 서리태 1 kg을 50°C의 온도에서 50%의 에탄올 용액 10 L에 침지하여 5 시간 동안 3 회 환류 추출한 다음, 상온에서 12 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 7~20%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.

[61]

[62] [실시예 4] 70% 에탄올 서리태 추출물의 제조

- [63] 건조된 서리태 1 kg을 50°C의 온도에서 70%의 에탄올 용액 10 L에 침지하여 5 시간 동안 3 회 환류 추출한 다음, 상온에서 12 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 7~20%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.
- [64]
- [65] [실시예 5] 20% 에탄올 서목태 추출물의 제조
- [66] 건조된 서목태 1 kg을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 수용액 5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.
- [67]
- [68] [실시예 6] 20% 에탄올 강낭콩 추출물의 제조
- [69] 건조된 강낭콩 300 g을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 수용액 1.5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.
- [70]
- [71] [실시예 7] 20% 에탄올 얼룩강낭콩 추출물의 제조
- [72] 건조된 얼룩강낭콩 300 g을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 수용액 1.5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.
- [73]
- [74] [실시예 8] 20% 에탄올 콩나물콩 추출물의 제조
- [75] 건조된 콩나물콩 300 g을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 1.5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.
- [76]
- [77] [실시예 9] 20% 에탄올 황태 추출물의 제조
- [78] 건조된 황태 1 kg을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 5 L에 침지하여 3 시간 동안 2 회 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 냉동 보관하였다.
- [79]
- [80] [실시예 10] 20% 에탄올 청태 추출물의 제조
- [81] 건조된 청태 300 g을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 1.5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은

여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 냉동 보관하였다.

[82]

[83] [실시예 11] 20% 에탄올 울타리콩 추출물의 제조

[84] 건조된 울타리콩 1 kg을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온 보관하였다.

[85]

[86] [실시예 12] 20% 에탄올 대두 추출물의 제조

[87] 건조된 대두 1 kg을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온 보관하였다.

[88]

[89] [실시예 13] 20% 에탄올 겨두 추출물의 제조

[90] 건조된 겨두 300 g을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 1.5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 냉장 보관하였다.

[91]

[92] [실시예 14] 20% 에탄올 적두 추출물의 제조

[93] 건조된 적두 300 g을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 1.5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온 보관하였다.

[94]

[95] [실시예 15] 20% 에탄올 흑태 추출물의 제조

[96] 건조된 흑태 300 g을 60°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 1.5 L에 침지하여 3 시간 동안 환류 추출한 다음, 상온에서 일정 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 3~15%이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온 보관하였다.

[97]

[98] [실시예 16] 서리태 부탄올 추출물의 제조

[99] 실시예 2에서 얻어진 20% 에탄올 서리태 추출물 25 g을 증류수 250 ml에 녹인 후 분별깔때기를 사용하여 n-부탄올 250 ml로 2 회 추출한 후 얻어진 부탄올층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료를 제조하였다. 수율은 5~15%이었으며, 제조된 시료는 사용시까지 냉동 보관하였다.

[100]

[101] [실시예 17] 서목태 부탄올 추출물의 제조

[102] 실시예 5에서 얻어진 20% 에탄올 서목태 추출물 1 g을 증류수 10ml에 녹인 후 분별깔때기를 사용하여 n-부탄올 10 ml로 2 회 추출한 후 얻어진 부탄올층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료를 제조하였다. 수율은 5~15% 이었으며, 제조된 시료는 사용시까지 냉동 보관하였다.

[103]

[104] [실시예 18] 울타리콩 부탄올 추출물의 제조

[105] 실시예 11에서 얻어진 20% 에탄올 울타리콩 추출물 25 g을 증류수 250 ml에 녹인 후 분별깔때기를 사용하여 n-부탄올 250 ml로 2 회 추출한 후 얻어진 부탄올층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료를 제조하였다. 수율은 5~15% 이었으며, 제조된 시료는 사용시까지 냉동 보관하였다.

[106]

[107] [실시예 19] 청태 부탄올 추출물의 제조

[108] 실시예 10에서 얻어진 20% 에탄올 청태 추출물 1 g을 증류수 10 ml에 녹인 후 분별깔때기를 사용하여 n-부탄올 10 ml로 2 회 추출한 후 얻어진 부탄올층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료를 제조하였다. 수율은 5~15% 이었으며, 제조된 시료는 사용시까지 저온 보관하였다.

[109]

[110] [실시예 20] 황태 부탄올 추출물의 제조

[111] 실시예 9에서 얻어진 20% 에탄올 황태 추출물 1 g을 증류수 10 ml에 녹인 후 분별깔때기를 사용하여 n-부탄올 10 ml로 2 회 추출한 후 얻어진 부탄올층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료를 제조하였다. 수율은 5~15% 이었으며, 제조된 시료는 사용시까지 저온 보관하였다.

[112]

[113] [실시예 21] 콩나물콩 부탄올 추출물의 제조

[114] 실시예 8에서 얻어진 20% 에탄올 콩나물콩 추출물 1g을 증류수 10 ml에 녹인 후 분별깔때기를 사용하여 n-부탄올 10 ml로 2 회 추출한 후 얻어진 부탄올층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료를 제조하였다. 수율은 5~15% 이었으며, 제조된 시료는 사용시까지 저온 보관하였다.

[115]

[116] [실시예 22] 대두 부탄올 추출물의 제조

[117] 실시예 12에서 얻어진 20% 에탄올 대두 추출물 25 g을 증류수 250 ml에 녹인 후 분별깔때기를 사용하여 n-부탄올 250 ml로 2 회 추출한 후 얻어진 부탄올층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료를 제조하였다. 수율은 5~15% 이었으며, 제조된 시료는 사용시까지 저온 보관하였다.

[118]

[119] [실시예 23] 강낭콩 부탄올 추출물의 제조

- [120] 실시예 6에서 얻어진 20% 에탄올 강낭콩 추출물 1 g을 증류수 10 ml에 녹인 후 분별깔때기를 사용하여 n-부탄올 10 ml로 2 회 추출한 후 얻어진 부탄올층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료를 제조하였다. 수율은 5~15% 이었으며, 제조된 시료는 사용시까지 저온 보관하였다.
- [121]
- [122] [실시예 24] 서리태 추출물 분획의 제조
- [123] 건조된 서리태 1 kg을 50°C의 온도에서 20%의 에탄올 용액 10 L에 침지하여 5 시간 동안 3 회 환류 추출한 다음, 상온에서 12 시간 동안 방치하였다.
- [124] 제조된 추출액을 여과하여 감압 농축한 후, 농축된 여과액에 에틸아세테이트 용액을 5 배수로 넣어 추출하였다. 상온에 방치하여 에틸아세테이트와 물층을 분리한 뒤, 에틸아세테이트층만 취하고, 동결 건조하여 에틸아세테이트 분획을 제조하였다. 동일한 방법으로 부탄올을 첨가하여 부탄올 분획을 제조하였으며, 최종적으로 남은 물층은 동결건조하여 물 분획으로 제조하였다. 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.
- [125]
- [126] [비교예] 물을 이용한 서리태 추출물의 제조
- [127] 건조된 서리태 1 kg을 100°C의 온도에서 물 10 L에 침지하여 5 시간 동안 3 회 환류 추출한 다음, 상온에서 12 시간 동안 방치하였다. 추출액은 여과하여 감압 농축하고 동결 건조하여 분말 시료를 제조하였다. 수율은 7~20% 이었으며, 조제된 분말은 사용시까지 저온에서 보관하였다.
- [128]
- [129] [실험예 1] 서리태 추출물의 콜라겐에 의해 유도된 사람 혈소판 응집 억제 관찰
- [130] 에탄올 함량에 따른 추출물의 활성 차이를 비교하기 위하여 하기의 실험을 실시하였다.
- [131] 사람의 혈소판 농축 혈장(Platelet Rich Plasma, PRP)를 분리하기 위하여, 3.2% 구연산 나트륨(sodium citrate)을 항응고제로 하여 2 주일 이상 약물을 복용하지 않은 건강한 남성의 정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채혈된 혈액 150 g을 15 분간 원심 분리한 후, 상층액 (PRP)을 얻고 잔사를 다시 원심분리하여 혈소판 결핍 혈장(platelet poor plasma (PPP))를 분리하였다. 분리된 PRP의 혈소판 수는 광학 현미경을 사용하여 세고, PRP를 PPP로 희석하여 1 ml당 3×10^8 개의 혈소판이 포함되도록 희석한 뒤에 실험에 사용하였다.
- [132] 혈소판의 응집 활성은, 혈소판 응집계(lumi-aggregometer, Chrono-Log Co., USA)를 이용하여, 흡광도 변화를 통해 측정하였다. PRP에 서리태 추출물을 100 $\mu\text{g/ml}$ 씩 가하고 열혼합기(thermomixer)에서 10 분간 배양하였다. 배양한 PRP 495 μl 를 실리콘이 코팅된 혈소판 응집계용 큐벳에 넣고 1 분간 선배양하여 37°C가 되도록 하였다. 그런 다음, 혈소판 응집 유발 시료인 콜라겐을 최대 응집을 일으키는 농도인 5 $\mu\text{g/ml}$ 를 가하고, 이 후 5 분간 반응을 관찰하였다. 관찰 결과는 표 1에 나타내었다. 표 1의 혈소판 응집 억제율(%)은, 콜라겐만 처리한 대조군의

혈소판 응집 억제율을 0%로 했을 때의 비교값을 나타낸 것이다.

[133] 표 1

	혈소판 응집 억제율(%)
물 추출물	8.3 ± 2.5
10% 에탄올 추출물	74.6 ± 6.4
20% 에탄올 추출물	40.1 ± 12.2
50% 에탄올 추출물	18.8 ± 10.9
70% 에탄올 추출물	12.5 ± 8.4

[134] 표 1을 참조하면, 10% 및 20% 에탄올 추출물이 다른 추출물에 비해 혈소판 응집 억제 효능이 우수한 것으로 나타났으며, 특히 10% 에탄올 추출물이 가장 우수한 것으로 나타났다.

[135] 또한, 20% 에탄올 추출물에서의 혈소판 응집 억제 효능에 대한 농도 의존성을 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 먼저, 추출물을 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가하고 상기와 동일한 실험을 진행하였다. 콜라겐만 처리한 대조군 혈소판 응집 억제율(inhibition)을 0%로 했을 때의 비교값을 도 1에 나타내었다. 도 1을 참조하면, 20% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 혈소판 응집 억제 효능을 나타내었으며, 이를 통해 우수한 항혈전생성능을 가진다는 것을 알 수 있다.

[136]

[137] [실험예 2] 울타리콩 추출물의 콜라겐에 의해 유도된 사람 혈소판 응집 억제 관찰

[138] 에탄올 함량에 따른 추출물의 활성 차이를 비교하기 위하여 하기의 실험을 실시하였다.

[139] 사람의 혈소판 농축 혈장을 (Platelet Rich Plasma, PRP)를 분리하기 위하여, 3.2% 구연산 나트륨(sodium citrate)을 항응고제로 사용하였으며, 2 주일 이상 약물을 복용하지 않은 건강한 남성의 정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채혈된 혈액 150 g을 15 분간 원심 분리한 후, 상층액(PRP)을 얻고 잔사를 다시 원심분리하여 혈소판 결핍 혈장(platelet poor plasma, PPP)를 분리하였다. 분리된 PRP의 혈소판 수는 세포 카운터를 사용하여 세고, PRP를 PPP로 희석하여 1 ml당 3×10^8 개의 혈소판이 포함되도록 희석한 뒤에 실험에 사용하였다.

[140] 혈소판의 응집 활성은 혈소판 응집계(lumi-aggregometer, Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 흡광도 변화를 통해 측정하였다. 2 분간 37°C가 되도록 열혼합기(thermomixer)에서 선 배양한 PRP에 울타리콩 추출물을 200 mg/ml 농도가 되도록 가하고 7 분간 배양하였다. 배양된 PRP 500 μl 를 실리콘이 코팅된 혈소판 응집계용 큐벳에 넣고 3 분간 배양하였다. 그런 다음, 혈소판 응집 유발 시료인 콜라겐을 최대 응집을 일으키는 최소 농도인 1~3 $\mu\text{g/ml}$ 를 가하고, 이 후 6 분간 반응을 관찰하였다. 관찰 결과는 표 2에 나타내었다. 표 2의 혈소판 응집

억제율(%)은, 콜라겐만 처리한 대조군의 혈소판 응집 억제율을 0%로 했을 때의 비교값을 나타낸 것이다.

[141] 표 2

	혈소판 응집 억제율(%)
물 추출물	69.0
10% 에탄올 추출물	57.3
20% 에탄올 추출물	76.3
30% 에탄올 추출물	38.7
40% 에탄올 추출물	34.7
50% 에탄올 추출물	39.7
70% 에탄올 추출물	10.7

[142] 표 2를 참조하면, 물과 10%, 20% 에탄올 추출물이 다른 추출물에 비해 혈소판 응집 억제 효능이 우수한 것으로 나타났으며, 그 중에서도 20% 에탄올 추출물이 혈소판 응집 억제 효능이 가장 우수한 것으로 나타났다.

[143]

[144] [실험예 3] 콩 종류 의존적 사람 혈소판 응집 억제 효능 관찰

[145] 활성이 우수한 것으로 나타난 20% 에탄올 추출 조건에서, 검은콩에서 혈소판 응집 억제 효능이 나타나는지 살펴보기 위하여, 하기의 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 콩은 모두 국산으로 구입하여 사용하였다.

[146] 검은콩의 일종인 서리태, 서목태 및 흑태에 대하여 실험을 실시하였다. 대상 콩들을 실시예 2와 동일한 방법으로 추출하였다. 또한, 항혈소판 응집 억제 효능을 관찰하기 위하여, 실험예 1과 동일한 조건에서 콩 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하여 실험을 진행하였다. 실험 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

[147] 표 3

콩의 종류	혈소판 응집 억제율(%)
서리태	45.31 $\pm$ 9.67
서목태	42.86 $\pm$ 11.02
흑태	41.78 $\pm$ 8.49

[148] 표 3을 참조하면, 혈소판 응집 억제 효능은 검은콩류인 서리태, 서목태 및 흑태에서 높게 나타났다. 따라서, 저농도 에탄올 추출물에서의 혈소판 응집 억제 효능은 서리태, 서목태 및 흑태를 포함하는 검은콩에서 우수하다는 것을 확인할 수 있다.

[149]

[150] [실험예 4] 콩 종류 의존적 사람 혈소판 응집 억제 효능 관찰

[151] 활성이 우수한 것으로 나타난 20% 에탄올 추출 조건에서, 다양한 콩에 대해 혈소판 응집억제 효능이 나타나는지 살펴보기 위하여, 하기의 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 콩은 모두 국산으로 구입하여 사용하였다.

[152] 거두, 대두, 서리태, 서목태, 울타리콩, 강낭콩, 적두, 청태, 콩나물콩, 황태 에 대하여 실험을 실시하였다. 대상 콩들은 실시예에 기술된 바와 같이 추출하였다. 또한, 항혈소판 응집 억제 효능을 관찰하기 위하여, 실험에 2와 동일한 조건에서 콩 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하여 실험을 진행하였다. 실험 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

[153] 표 4

콩의 종류	혈소판 응집 억제율(%)
거두	31.0
대두	19.3
서리태	65.3
울타리콩	76.3
강낭콩	31.0
적두	32.0
청태	16.5
콩나물콩	37.5
황태	2.5

[154] 표 4를 참조하면, 혈소판 응집 억제 효능은 서리태, 서목태, 울타리콩에서 우수한 것으로 나타났다.

[155]

[156] [실험예 5] 혈소판 응집 자극원별 활성 억제 특이성 관찰

[157] 20% 에탄올 추출 조건에서, 서리태 추출물이 혈소판 응집 자극원에 따라 특이적 활성 억제 효능을 보이는지 살펴보기 위한 실험을 실시하였다.

[158] 혈관이 손상되면 그 부위의 내피세포층이 파괴되면서 혈액내로 노출되는 콜라겐(collagen), 혈소판에서 분비하는 ADP, 혈류로 인한 자극(Shear Stress, 이하 SS), 트롬빈(thrombin)은 혈소판 응집을 자극하는 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 20% 저농도 에탄올 서리태 추출물이 콜라겐, ADP, 트롬빈(thrombin), 혈류자극(SS)에 의한 활성 억제 특이성을 가지는지에 대해 실험해 보았다. 평가는 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 실시하였으며, 실험예 1의 콜라겐 대신 ADP, 트롬빈, 혈류자극을 가하였다. 실험 결과는 표 5에 나타내었다.

[159] 표 5

	콜라겐	ADP	트롬빈	혈류자극
혈소판 응집 억제율 (%)	61.38 ± 10.44	8.25 ± 3.10	19.61 ± 4.52	12.36 ± 3.68

[160] 표 5에서 알 수 있는 것처럼, 20% 에탄올 처리된 추출물은 콜라겐으로 유도된 혈소판 응집을 특이적으로 억제하였으나, ADP, 트롬빈, 혈류자극 등 다른 자극제로 유도된 혈소판 응집에 대한 억제 효과는 미약하였다.

[161]

[162] [실험예 6] 혈소판 응집 후 활성 물질 발현 및 분비 억제 효능 관찰

[163] 혈소판이 콜라겐 등에 의해 자극을 받아 응집을 일으키게 되면, 혈소판 표면 내에 특정 단백질을 발현시키거나, 세포 밖으로 특정 분비 물질을 방출하게 된다. 따라서, 본 실험에서는 20% 저농도 에탄올 처리된 추출물이 혈소판 응집을 억제함으로써, 혈소판 표면에 발현되는 P-셀렉틴(p-selectin)을 감소시키고, 혈액 내로 방출되는 세로토닌(serotonin) 농도를 감소시키는 효능을 관찰하였다.

[164] 실험예 1과 동일한 PRP에 시료를 가하고 인큐베이터에서 10 분간 배양한 후, 혈소판 응집 자극원인 콜라겐을 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 가하고 6 분간 반응시켰다. 추출물을 취하여 항-CD42b-PE와 항-CD62P-FITC와 함께 시험관에 가하고 차광 조건에서 20 분간 반응시켰다. 여기에 티로드 완충액(tyrode buffer) 500 μl 를 가함으로써 반응을 종결시켰다.

[165] 측정은 형광세포 분석기(FACS, BD bioscience, USA)에서 분석하였다. P-셀렉틴의 발현 정도는, 아무것도 가하지 않은 형광량을 기준으로, P-셀렉틴의 발현양에 따라 형광량이 얼마나 줄어드는가를 측정하였다. 측정결과는 표 6에 나타내었으며, 추출물을 처리하지 않은 비처리군의 형광량을 100으로 하였을 때 상대적인 p-셀렉틴의 발현량을 고려하여 발현 억제율을 환산한 값을 표시하였다.

[166] 표 6

처리농도($\mu\text{g/ml}$)	10	25	50	100
P-셀렉틴 발현 억제율 (%)	13.8 ± 2.3	19.8 ± 1.6	24.1 ± 2.2	36.9 ± 1.9

[167] 표 6에서 알 수 있는 것처럼, 20% 에탄올 처리된 추출물은 혈소판이 응집되면서 표면에 발현되는 P-셀렉틴의 양을 감소시키는 것을 알 수 있으며, 그 효과는 농도 의존적으로 나타났다.

[168] 또한, 세로토닌(serotonin)의 분비를 측정하는 방법은 방사능동위원소법을 이용하였다. 실험예 1과 동일한 PRP를 이용하여 ^{14}C -세로토닌 (Amersham

bioscience, CFA170)을 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ 되도록 가한 후, 45 분간 37°C에서 처리하였다. ^{14}C -세로토닌을 첨가한 PRP에 추출물을 가한 후 10 분간 37°C에서 처리한 후, 콜라겐 2 $\mu\text{g/ml}$ 를 가하여 6 분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 EDTA를 가하여 반응을 종결시키고, 12000xg 2 분간 원심분리하여 상층액만을 취하였다. 분비된 [^{14}C]-세로토닌의 양은 액체섬광계수기(liquid scintillation counter, Wallac 1409, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 비처리군의 세로토닌 분비량을 100으로 하였을 때의 상대값을 기준으로 분비 억제율을 환산한 값을 표 7에 나타내었다.

[169] 표 7

처리농도($\mu\text{g/ml}$)	세로토닌 분비 억제율 (%)
10	9.8 ± 2.5
25	17.7 ± 3.2
50	38.0 ± 2.2
100	59.4 ± 1.3

[170] 표 7을 참조하면, 20% 에탄올 처리 추출물은 혈소판이 응집되면서 혈액 내로 방출하는 세로토닌의 분배 억제 효율을 증가시키는 것을 알 수 있으며, 그 효과는 농도 의존적으로 나타났다.

[171]

[172] [실험예 7] SD 래트를 이용한 정맥혈전생성 억제 효과 관찰

[173] 20% 에탄올을 이용한 처리 추출물을 실제 섭취하였을 경우 생체 내에서 혈전생성억제 효능이 있는지 알아보기 위한 실험을 실시하였다. 체중 220~250 g의 숫컷 SD(Sprague Dawley) 래트(rat)를 대상으로 정맥혈전생성 억제 효능 시험을 실시하였다.

[174] SD 래트에 각각 0, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 추출물을 식염수(saline) 300 μl 에 용해시켜 경구로 투여한 뒤, 1 시간 동안 방치하였다. 1 시간 후, 펜토바비탈나트륨(sodium pentobarbital) 50 mg/kg을 복강투여하여 전신 마취시킨 후, 개복하고 후대정맥(caudal vena cava)이 잘 보이도록 지방조직을 걷어내었다. 지방조직을 걷어낼 때 주변의 혈관이 손상되지 않도록 주의하였다. 5% FeCl_3 용액을 필터페이퍼(filter paper)에 적셔 후대정맥 위에 5 분간 적용한 후 제거하였다. 30 분 후, 혈전을 함유하고 있는 후대정맥을 12 mm 길이로 결찰한 후 절제하였다. 식염수에 혈전 덩어리를 떼어낸 후 수분은 제거하고 무게를 측정하여 각 시험군을 비교하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[175] 도 2을 참조하면, 처리 추출물 50, 100 mg/kg을 경구 투여하였을 때, 100 mg/kg에서 유의적으로 혈전 생성이 억제되는 것을 알 수 있다.

[176] 또한, 동일한 방법으로 14 일간 50, 100 mg/kg의 농도로 장기간 경구투여 한 결과를 살펴보았으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 상기 투여 후 1 시간 동안

방치한 경우와는 달리 50, 100 mg/kg에서 모두 유의적으로 혈전 생성이 억제되는 것을 알 수 있다. 따라서, 저농도 에탄올을 이용한 서리태 추출물은 우수한 항혈전제로 작용하였음을 알 수 있다.

[177]

[178] [실험에 8] 서리태 분획별 사람 혈소판 응집 억제 효능 관찰

[179] 20% 에탄올 추출 조건에서, 어떤 부분이 우수한 활성을 나타나는지 살펴보기 위한 실험을 실시하였다.

[180] 먼저, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획을 상기 실시예 25의 방법으로 제조하였다. 각 분획에 대한 혈소판 응집 억제 효능은, 상기 실험에 1과 동일한 방법을 사용하여, 각 분획별 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 사용하여 실시하였다. 결과는 표 8에 나타내었다.

[181] 표 8

	혈소판 응집 억제율(%)
에틸아세테이트 분획	95.2 $\pm$ 0.9
부탄올 분획	76.8 $\pm$ 6.9
물 분획	4.7 $\pm$ 5.2

[182] 표 8에서 알 수 있는 것처럼, 혈소판 응집 억제 효능은 에틸아세테이트 분획이 가장 우수하였으며, 부탄올, 물 분획 순으로 활성이 감소하였다. 따라서, 저농도 에탄올 추출물에서의 혈소판 응집 억제 효능은 에틸아세테이트 분획에 포함된 활성 성분에 의한 것으로 추측할 수 있다.

[183] 또한, 가장 효과가 우수한 것으로 나타난 에틸아세테이트 분획에 대한 농도의존적 활성에 대해서는 도 4에 나타내었다. 도 4를 참조하면, 에틸아세테이트 분획 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 사용하였을 때, 혈소판 응집 억제 효능이 농도 의존적으로 발생하는 것을 확인하였다.

[184]

[185] [실험에 9] 각 콩의 부탄올 분획의 혈소판 응집 억제 활성

[186] 각 콩의 부탄올 분획의 혈소판 응집 억제 효능이 나타나는지 확인하기 위해 하기의 실험을 실시하였다.

[187] 대두, 서목태, 서리태, 울타리콩, 강낭콩, 청태, 콩나물콩 및 황태의 부탄올 분획에 대해서 실험에 2와 동일한 조건에서 콩 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하여 실험을 진행하였다. 실험 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

[188] 표 9

콩의 종류	혈소판 응집 억제율(%)
대두	94.0
서목태	90.5
서리태	72.7
울타리콩	88.5
강낭콩	77.5
청태	91.5
콩나물콩	90.5
황태	88.5

[189] 표 9를 참조하면, 각 콩의 부탄을 분획 모두 혈소판 응집 억제 효능이 우수한 것으로 나타났다.

[190]

[191] [실험예 10] 에틸 아세테이트 분획의 혈소판응집 자극원별 활성 억제 특이성 관찰

[192] 에틸아세테이트 분획이 혈소판 응집 자극원별로 활성 억제의 특이성을 가지는지 살펴보기 위하여 상기 실험예 5와 동일한 방법으로 실험을 수행하였고, 단지 처리 농도는 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 실시하였다. 그 결과는 표 10에 나타내었다.

[193] 표 10

	처리농도	콜라겐	ADP	트롬빈	혈류자극
혈소판 응집 억제율 (%)	50 $\mu\text{g/ml}$	80.6 $\pm$ 0.8	25.1 $\pm$ 9.2	0.6 $\pm$ 3.3	16.0 $\pm$ 2.3
	100 $\mu\text{g/ml}$	94.0 $\pm$ 1.9	53.7 $\pm$ 6.3	9.1 $\pm$ 7.7	36.9 $\pm$ 3.0

[194] 표 10에서 알 수 있듯이, 에틸아세테이트 분획은 콜라겐 응집원에 특이적으로 활성을 억제하는 것을 알 수 있으며, 그 효과는 농도 의존적으로 나타났다.

[195]

[196] [실험예 11] 에틸아세테이트 분획의 혈소판 응집 후 활성 물질 발현 및 분비 억제 효능 관찰

[197] 서리태의 에틸아세테이트 분획이 혈소판 응집후 발현되는 P-셀렉틴을 감소시키고, 세로토닌의 분비를 감소시키며, 트롬복산 생성을 억제시키는 효과를 살펴보기 위해서, P-셀렉틴과 세로토닌은 상기 실험예 6과 동일한 방법으로 실험을 수행하였다. 또한, 트롬복산 생성 억제율은 실험예 1에서 사용한 PRP에 에틸아세테이트 분획을 가하고 37°C에서 10 분간 배양한 후, 콜라겐 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 가하고 6 분간 반응시켰다. 시료의 일부를 취하여 EDTA,

인도메타신(indomethacin, 최종 50 μ M)이 담긴 시험관에 가하여 반응을 종결시키고 12000xg 2 분간 원심분리하여 상층액만을 취하여 생성된 트롬복산을 효소면역법을 사용하여 정량하였다.

[198] 에틸 아세테이트 분획에 의한 P-셀렉틴의 발현 억제는 표 11, 세로토닌 분비 억제율은 표 12, 그리고 트롬복산 생성 억제율은 표 13에 각각 나타내었다.

[199] 표 11

처리농도(μ g/ml)	10	25	50	100
P-셀렉틴 발현 억제율 (%)	16.2 $\pm$ 2.3	39.0 $\pm$ 1.5	58.8. $\pm$ 0.3	73.7 $\pm$ 0.2

[200] 표 12

처리농도(μ g/ml)	10	25	50	100
세로토닌 분비 억제율 (%)	12.3 $\pm$ 2.3	40.3 $\pm$ 2.0	66.8 $\pm$ 3.1	89.6 $\pm$ 0.6

[201] 표 13

처리농도(μ g/ml)	10	25	50	100
트롬복산 생성 억제율 (%)	2.6 $\pm$ 0.5	5.4 $\pm$ 3.7	11.4. $\pm$ 3.2	38.3 $\pm$ 3.6

[202] 표 11, 12 및 13을 통해 알 수 있는 것처럼, 서리태의 에틸아세테이트 분획은 혈소판 응집후 발현되는 P-셀렉틴을 감소시키고, 세로토닌 분비를 억제하며, 트롬복산 생성을 억제하는 것으로 관찰되었으며, 그 효능은 농도 의존적으로 나타나는 것을 알 수 있었다.

[203]

[204] [실험예 12] SD 래트를 이용한 에틸아세테이트 분획의 정맥혈전생성 억제 효과 관찰

[205] 에틸아세테이트 분획이 실제 섭취하였을 경우 생체 내에서 혈전생성억제 효능이 있는지 알아보기 위하여 상기 실험예 7와 동일한 방법으로 실험을 실시하였다. 경구투여한 농도는 10, 25, 50 mg/kg 농도였으며, 투여 1시간 후에 생성된 혈전의 크기를 도 5에 나타내었다.

[206] 도 5에서 알 수 있는 것처럼, 에틸아세테이트 분획은 섭취만으로도 혈전 생성을 농도 의존적으로 억제하였다.

[207]

[208] [실험예 13] SD 래트(rat)로부터 분리한 혈소판 응집 억제 효능 관찰

[209] 서리태의 저농도 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획이 래트(rat)로부터 분리한 혈소판의 응집 억제 효과가 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 구체적인 실험 과정은 상기 실험에 1과 동일하다. 처리 농도는 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 그 결과는 표 14에 나타내었다.

[210] 표 14

	처리농도	10	25	50	100
혈소판 응집 억제율 (%)	저농도추출물	3.7 ± 1.2	17.1 ± 2.3	36.3 ± 5.7	46.5 ± 5.4
	에틸아세테이트 분획	17.1 ± 6.9	48.6 ± 3.8	66.1 ± 2.9	80.0 ± 4.4

[211] 표 14에서 알 수 있는 것처럼, 에탄올 저농도 추출물뿐만 아니라 에틸아세테이트 분획 모두 래트에서 유래한 혈소판의 응집 억제 효능이 매우 우수하였고, 그 활성은 농도 의존적으로 나타나는 것을 관찰하였다.

[212]

[213] [실험에 14] 혈관링을 이용한 혈관 수축 억제 효능 관찰

[214] 체중 250~300 g의 실험용 웅성 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 대한바이오링크(Seoul, Korea)로부터 공급받아, 사육실 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 45-55%를 유지하고, 오전 7 시와 오후 7 시를 기준으로 밤과 낮의 주기가 각각 12 시간이 되도록 하였다. 사료 (퓨리나코리아, Seoul, Korea)와 물은 제한없이 공급하도록 하여 일주일간 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

[215] 흰쥐를 실험 치사시킨 후, 개흉하여 신속하게 흉부 대동맥(thoracic aorta)을 적출한 다음, 95% O_2 /5% CO_2 의 혼합 가스로 포화된 KR 완충액(조성(mM); NaCl 115.5, KCl 4.6, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 25.0, disodium. Ca^{2+} EDTA 0.026mM, glucose 11.1, pH 7.4)으로 옮겼다. 혈관 내의 혈액과 주변의 지방 및 결합 조직 등을 제거하고, 길이 3~4 mm의 혈관링을 만들었다. 혈관링은 초기 30 분간 점진적으로 장력을 주어 평형 상태에 도달하도록 한 뒤, 페닐에프린(phenylephrine) 10^{-6}M 으로 수축시킨 후, 아세틸콜린(acetylcholine) 10^{-6}M 을 가하여 이완시켰을 때 이완율이 80% 이상인 것을 사용하였다. 95% O_2 /5% CO_2 의 혼합가스로 포화시킨 90 mM KCl을 함유한 KR 완충액으로 수조(bath) 내의 완충액을 교환하여 혈관의 수축을 유도하였으며, 이것을 최대 수축으로 삼았다. 혈관에 서리태 추출물을 각 농도별로 30 분 동안 전처리 한 다음, 수조상에서 수축 유발 페닐에프린을 점차적으로 높은 농도로 가하여, 이에 대한 용량-수축 반응 곡선을 관찰하였다. 혈관 수축력은 90 mM KCl에 의해 유발된 혈관 수축을 표 15와 표 16에 나타내었다.

[216] 표 15

페닐에프린 농도 (uM)	대조군(수축율 %)	서리태 추출물(수축율 %)
0.1	15.26 ± 7.04	0.39 ± 0.27
1	60.35 ± 4.83	16.30 ± 3.44
10	92.13 ± 8.46	40.02 ± 7.57
100	97.69 ± 10.54	53.68 ± 10.08

[217] 표 15를 참조하면, 수축 유발제인 페닐에프린의 처리 농도가 높아질수록 혈관 수축율이 증가하는 것을 알 수 있으며, 서리태 추출물의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 페닐에프린 농도에 따라 의존적으로 혈관 수축 억제 효능을 보였다.

[218] 표 16

농도	대조군	서리태 추출물 ($\mu\text{g/ml}$)	
		25	50
수축율 (%)	87.55 ± 16.01	70.45 ± 9.56	59.6 ± 6.69

[219] 표 16을 참조하면, 서리태 추출물을 농도를 달리하여 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리할 경우, 농도 의존적으로 혈관 수축을 방지하는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 20% 에탄올 서리태 추출물은 매우 뛰어난 혈관 수축 억제 효능이 있다는 것을 관찰할 수 있었다.

[220]

[221] [실험예 15] 동물모델에서의 혈청 및 간 지질 수치 저하

[222] 체중 250~300 g의 8 주령의 암컷 쥐를 사용하여 우리당 8 마리씩, 22±2°C의 항온 및 55±15%의 상대 습도가 유지되고 12 시간의 명암 주기가 제공되는 폴리카보네이트 우리에서 수용하였다. 또한, 정상식이 및 고콜레스테롤 식이를 공급하고 식수를 자유롭게 음용토록 하였다.

[223] 양성 대조군으로는 고지혈증 치료제로 사용되는 페노피브린산(200 mg/kg)을 사용하였으며, 1% 메틸셀룰로즈(MC)에 현탁하여 경구투여 하였다. 서리태 추출물(200 mg/kg)은 1 일 1 회 경구투여에 의해 4 주간 제공하였다. 12 시간 절식시킨 뒤에, 안와 정맥으로부터 혈액 샘플을 취하여 10000 rcf(relative centrifugal force)에서 10 분간 원심분리하였다. 원심분리 후 수득된 혈청을 사용하여 혈중 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방의 혈장 수준을 평가하였다.

[224] 분석은 혈액자동분석기와 로슈 진단키트를 사용하여 수행하였으며, 얻어진 결과를 하기 표 17(혈청 지질) 및 표 18(간 지질)에 나타내었다.

[225] 표 17

구분(mg/dl)	정상군	대조군	양성대조군	서리태 추출물
총콜레스테롤	114.25 ± 2.41	218.57 ± 20.44	112.42 ± 13.33	156.42 ± 10.21
HDL-콜레스테롤	84.85 ± 0.35	55.72 ± 3.56	87.89 ± 6.84	50.35 ± 6.88
LDL-콜레스테롤	30.5 ± 6.42	134.75 ± 9.41	75.34 ± 2.80	97.21 ± 10.44

[226] 표 17에서 볼 수 있듯이, 4 주간 고콜레스테롤 사료를 섭취한 쥐에서 혈청 총콜레스테롤 수치는 정상군보다 대조군이 약 2 배, LDL-콜레스테롤 값은 약 4.4 배 증가했다. 이러한 결과로부터, 고지혈증 유발 식이에 의한 고지혈증 유발이 잘 수행되었다는 것을 확인하였다. 서리태 추출물을 고지혈증 유발 식이와 동시 투여한 군에서는, 총콜레스테롤 수치가 156.42 mg/dl로 대조군보다 약 28% 감소되었고, LDL-콜레스테롤 수치는 약 28% 감소되었다.

[227] 표 18

구분(μ g/mg)	정상군	대조군	양성 대조군	서리태 추출물
총콜레스테롤	5.81 ± 0.85	27.96 ± 2.46	15.43 ± 0.52	13.50 ± 7.62
중성지방	199.91 ± 24.33	230.35 ± 10.53	185.39 ± 23.84	172.32 ± 11.16

[228] 간 지질 역시, 정상군의 총 콜레스테롤과 중성지방 수치를 표 18에서 확인할 수 있다. 대조군에서 고지혈증 유발 식이에 의해서 지방간 형태로 유도되었음을 확인할 수 있다. 서리태 추출물 처리군의 경우 총콜레스테롤은 52%가 감소하였고, 중성지방은 25% 감소한 것을 확인할 수 있다. 따라서 서리태 추출물은 생체내 혈청 및 간 지질 개선에 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다.

[229]

[230] [실험예 16] 서리태 추출물 분획에 대한 유효성분 분석

[231] 서리태 추출물의 활성 성분을 규명하기 위하여 에틸아세테이트 분획을 중심으로 정량분별기법(assay guided fractionation)을 수행하였다. 제작된 에틸아세테이트 분획에 대한 활성 성분을 분리하고 정제한 전체적인 구조(scheme)는 도 6과 같다.

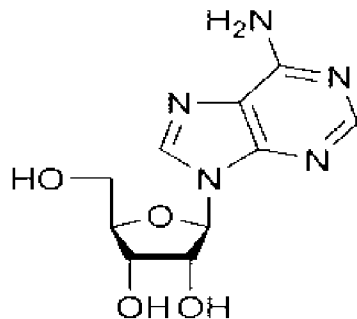
[232] 도 6을 참조하면, 실시예 25에 따른 20% 에탄올 서리태 추출물의 에틸아세테이트 분획(A-2)에 대하여 고체상 추출(solid phase extraction)을 실시하였다. 고체상 추출시에는 용매로 50 내지 100%(v/v) 메탄올(MeOH) 용액을 사용하였다. 고체상 추출을 거친 추출액을 A-3부터 A-9까지 분류하였다. 고체상 추출을 거친 추출액에 대한 혈소판 응집율을 평가하였고, 그 결과는 도 7에 나타내었다. 도 7을 참조하면, A-3와 A-4 추출액의 혈소판 응집율이 상대적으로

낮은 것으로 나타났다.

- [233] 혈소판 응집율이 상대적으로 낮게 나타난 A-3와 A-4 추출액을 혼합한 혼합용액에 대하여 컬럼 크로마토그래피(Sephadex LH 20 column chromatography)를 실시하여 구성성분들을 분리하였다. 분리된 성분들은 A-3-1부터 A-3-10까지 넘버링을 하였다. 컬럼 크로마토그래피를 거친 A-3-1부터 A-3-10에 대하여, 다시 혈소판 응집율을 평가하였고, 그 결과는 도 8에 나타내었다. 도 8을 참조하면, 컬럼 크로마토그래피를 거친 A-3-1부터 A-3-10 중에서 A-3-1 시료의 혈소판 응집율이 가장 낮은 것으로 확인되었다.
- [234] 혈소판 응집율이 가장 낮은 것으로 나타난 A-3-1 시료에 대하여 고성능 액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, Preparative ODS HPLC)를 통해 유효성분들을 다시 분리하였다. 분리된 성분들은 A-3-1-1부터 A-3-1-7까지 넘버링을 하였으며, 이들에 대하여 혈소판 응집율을 측정하였다. 혈소판 응집율의 측정결과는 도 9에 나타내었다. 도 9를 참조하면, A-3-1-3의 혈소판 응집율이 가장 낮은 것으로 확인되었다. 분리 정제 및 활성 실험을 통해 최종적으로 A-3-1-3의 혈소판 응집 억제 활성이 우수한 것으로 확인되었다.
- [235] 위에서 분리 정제한 A-3-1-3과 아데노신 표준품에 대하여 혈소판 응집 억제 활성을 비교하였다. 비교한 결과는 도 10에 나타내었다. 도 10을 참조하면, A-3-1-3은 아데노신(adenosine)과 거의 동일한 효과를 보였으며, 이를 통해 A-3-1-3은 아데노신 단일 성분으로 이루어져 있음을 확인하였다. 아데노신의 화학적 구조는 하기 화학식 1과 같다.

[236] [화학식 1]

[237]



[238]

[239] [실험예 17] 20% 에탄올 서리태 추출물에 함유된 아데노신 함량측정

[240] 20% 에탄올 서리태 추출물과 아데노신 표준품과의 활성을 비교하였으며, 그 결과는 도 11과 도 12에 나타내었다. 도 11과 도 12를 참조하면, 서리태 추출물과 아데노신 표준품과의 활성 비교를 통해, 20% 에탄올 서리태 추출물에는 약 0.35~0.5%의 아데노신이 함유된 것으로 산출된다. 이를 통해 저농도의 저급 알코올을 이용하여 서리태를 추출할 경우, 추출물 내의 아데노신 함량이 매우 우수하다는 것을 알 수 있다. 또한, 아데노신 단독으로 사용한 경우보다, 서리태 추출물이 혈전 생성율이 낮음을 알 수 있다. 따라서, 서리태 추출물을 사용하는

경우 아데노신 단독으로 사용하는 경우보다 안정적인 형태로 혈전 생성을 억제할 수 있을 것이다.

[241]

[242] [실험예 18] 20% 에탄올 콩 추출물에 함유된 아데노신 함량측정

[243] 서리태를 포함한 여러 종류의 콩에 대하여, 20% 에탄올로 추출한 추출물 내에 함유된 아데노신의 함량을 측정하였다. 측정결과는 하기 표 19에 나타내었다.

[244] 표 19

콩 종류	아데노신 함량(%)
서리태	0.36
서목태	0.20
청태	0.19
황태	0.16
강낭콩	0.29
콩나물콩	0.15
울타리콩	0.34

[245] 표 19를 참조하면, 여러 종류의 콩들에 대해서 전체적으로 0.15% 이상의 높은 함량으로 아데노신이 함유된 것으로 확인되었다. 특히, 서리태와 울타리콩 추출물에 함유된 아데노신 함량이 상대적으로 높은 것을 확인할 수 있다.

[246]

[247] [실험예 19] 서리태 추출물의 적혈구에서의 응고 촉진 활성 억제능 측정

[248] 콩 추출물이 염증상태에서 생성되는 내인성 물질인 LPA(lysophosphatidic acid)와 PA(phosphatidic acid)에 의한 적혈구의 PA(phosphatidyl serine) 노출 및 MV(microvesicle) 생성에 관여하는 지를 확인하는 실험을 실시하였다.

[249] 일반적으로 적혈구가 PS에 노출되거나 MV가 생성되면 혈전 생성이 촉진되는 것으로 알려져 있다. 염증상태에서 서리태 추출물을 가한 후, 내인성 물질인 LPA와 PA에 의한 PS 노출 및 MV 생성의 저해 여부를 측정하였다. 구체적으로는 서리태 추출물 100 μ g/ml를 가한 후 1 시간이 경과된 시점에서, 50 μ M LPA 또는 25 μ M PA를 15분간 가하여 PS 노출 및 MV 생성을 일으켰다. 그런 다음, 서리태 추출물을 가한 경우(+)와 그렇지 않은 경우(-)를 비교하여, PS 노출 정도 및 MV 생성 정도를 각각 비교 측정하였다. PS 노출 정도를 측정한 결과는 도 13에 나타내었고, MV 생성 정도를 측정한 결과는 도 14에 나타내었다.

[250] 도 13과 14를 통해, 서리태 추출물은 LPA와 PA에 의한 PS 노출 및 MV 생성을 저해하는 것으로 확인되었다.

[251] 나아가서 노출된 PS를 매개로 응고촉진 활성(procoagulant activity)의 변화를 프로트롬빈 분해효소 분석(prothrombinase assay)을 통해, 트롬빈(thrombin) 생성

정도를 측정하였다. 측정결과는 도 15에 나타내었으며, (+)는 서리태 추출물이 가해진 경우이고, (-)는 그렇지 않은 경우를 의미한다. 도 15를 참조하면, 서리태 추출물에 의해 LPA와 PA에 의한 트롬빈(thrombin) 생성이 저해되었음을 알 수 있다.

[252]

[253] [실험예 20] 서리태 추출물의 혈액 응고 억제에 미치는 영향 평가

[254] 혈액 응고는 여러 가지 자이모젠(zymogen)인 응고인자(coagulation factor)들이 연속적으로 활성화되어, 마지막으로 피브리노젠(fibrinogen)을 피브린(fibrin)으로 변화시킴으로써 혈전(blood clot)을 이루는 과정이다. 여기에는 콘택트 시스템(contact system)이라 불리는 내인성 경로(intrinsic pathway)와 조직 인자(tissue factor)에 의한 활성화를 시작으로 하는 외인성 경로(extrinsic pathway)가 존재하여 혈전(blood clot) 생성을 유발한다.

[255] 20% 에탄올 서리태 추출물이 응고과정(coagulation cascade)의 외인성 경로(extrinsic pathway) 또는 내인성 경로(intrinsic pathway)에 영향을 주는지를 각각 프로트롬빈 시간(prothrombin time, PT)과 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time, aPTT)을 이용하여 평가하였다.

[256] PT 측정은 다음과 같은 과정으로 실시하였다. 래트(rat)에서 혈액을 채취하고 항응고제로 3.8% 구연산소다(sod. Citrate)를 사용하여 원심분리하며 상등액만을 취하였다. 리콤비플라스틴(RecombiPlasTin)을 가하고 피브리노미터 기계를 이용하여 피브린이 형성되는 시간을 측정하였다. 피브린이 형성되는 시간이 증가할수록 혈액 응고를 억제하는 것을 의미한다.

[257] aPTT 측정은 다음과 같이 실시하였다. 래트(rat)에서 혈액을 채취하고 항응고제로 3.8% 구연산소다(sod. Citrate)를 사용하며 원심분리하며 상등액만을 취하였다. 염화칼슘(CaCl_2) 20 mM 액을 튜브에 옮겨담고 혈장 100 μL 를 취하여 피브리노미터 기계를 이용하여 피브린이 형성되는 시간을 측정하였다.

[258] PT 평가 결과는 도 16에 나타내었고, aPTT 평가 결과는 도 17에 나타내었다.

[259] 도 16 및 도 17을 통해, 20% 에탄올 서리태 추출물은 PT 및 aPTT에는 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 서리태 추출물은 혈액의 정상적인 응고에는 영향을 주지 않으므로, 지금까지 알려진 항혈전제제(아스피린 등)의 커다란 부작용으로 알려진 지혈 방해 및 과출혈 가능성에는 영향을 주지 않을 것으로 판단된다.

[260]

[261] [실험예 21] 서리태 추출물이 출혈 시간 지연에 미치는 영향 평가

[262] 20% 에탄올 서리태 추출물, 아스피린 및 클로피도그렐을 각각 처리한 경우 출혈시간을 비교 측정하였다. 측정결과는 도 18에 나타내었다.

[263] 도 18을 참조하면, 아스피린과 클로피도그렐의 경우에는 출혈시간이 현저히 증가되었으나, 서리태 추출물을 처리한 경우에는 출혈시간의 변화가 거의 나타나지 않았다. 또한, 처리량이 100 mg/kg에서 500 mg/kg으로 5 배 증가된

경우에도 출혈시간에는 거의 변동이 없는 것으로 확인되었다. 따라서, 섭취 또는 처리량이 증가되어도 출혈 시간 증가와 같은 부작용은 거의 나타나지 않는 것을 알 수 있다.

[264]

[265] 본 발명에 의한 콩 추출물 함유 조성물은 하기와 같이 여러 가지 제형으로 응용 가능하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[266]

[267] [제제예 1] 연질캡셀제

[268] 서리태 추출물 100 mg, 대두추출물 50 mg, 대두유 180 mg, 홍삼추출물 50 mg, 팜유 2 mg, 팜경화유 8 mg, 황납 4 mg 및 레시틴 6 mg을 혼합하고, 통상의 방법에 따라 1 캡슐당 400 mg씩 충전하여 연질캡셀을 제조하였다.

[269]

[270] [제제예 2] 정제

[271] 울타리콩 추출물 100 mg, 대두추출물 50 mg, 포도당 100 mg, 홍삼추출물 50 mg, 전분 96 mg 및 마그네슘 스테아레이트 4 mg을 혼합하고 30% 에탄올을 40 mg 첨가하여 과립을 형성한 후, 60°C에서 건조하고 타정기를 이용하여 정제로 타정하였다.

[272]

[273] [제제예 3] 과립제

[274] 서리태 추출물 100 mg, 대두추출물 50 mg, 포도당 100 mg, 홍삼추출물 50 mg 및 전분 600 mg을 혼합하고 30% 에탄올을 100 mg 첨가하여 과립을 형성한 후, 60°C에서 건조하여 과립을 형성한 다음 포에 충전하였다. 내용물의 최종 중량은 1 g으로 하였다.

[275]

[276] [제제예 4] 드링크제

[277] 서목태 추출물 100 mg, 대두추출물 50 mg, 포도당 10 g, 홍삼추출물 50 mg, 구연산 2 g 및 정제수 187.8 g을 혼합하고 병에 충전하였다. 내용물의 최종 용량은 200 ml로 하였다.

[278]

[279] [제제예 5] 건강 식품의 제조

[280] 서리태 추출물..... 1000 mg

[281] 비타민 혼합물

[282] 비타민 A 아세테이트.....70 μ g

[283] 비타민 E 1.0 mg

[284] 비타민 B1..... 0.13 mg

[285] 비타민 B2 0.15 mg

[286] 비타민 B6..... 0.5 mg

[287] 비타민 B12..... 0.2 μ g

- [288] 비타민 C..... 10 mg
- [289] 비오틴..... 10 μ g
- [290] 니코틴산아미드..... 1.7 mg
- [291] 엽산..... 50 μ g
- [292] 판토텐산 칼슘..... 0.5 mg
- [293] 무기질 혼합물
- [294] 황산제1철..... 1.75 mg
- [295] 산화아연..... 0.82 mg
- [296] 탄산마그네슘..... 25.3 mg
- [297] 제1인산칼륨..... 15 mg
- [298] 제2인산칼슘..... 55 mg
- [299] 구연산칼륨..... 90 mg
- [300] 탄산칼슘..... 100 mg
- [301] 염화마그네슘..... 24.8 mg
- [302] 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.

[303]

[304] [제제예 6] 건강 음료의 제조

- [305] 울타리콩 추출물..... 1000 mg
- [306] 구연산..... 1000 mg
- [307] 올리고당..... 100 g
- [308] 매실농축액..... 2 g
- [309] 타우린..... 1 g
- [310] 정제수를 가하여 전체..... 900 ml

[311] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안
85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ용기에 취득하여
밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[312]

[313] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합
조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에
따라서 그 배합비율을 임의로 변형 실시하여도 무방하다. 본 발명이 속한 기술
분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주
내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

산업상 이용가능성

[314] 본 발명에 따른 조성물은 의약 및 식품 분야 등에서 다양하게 활용 가능하다.

청구범위

- [청구항 1] 1% 내지 70%(v/v) 농도의 $C_1 \sim C_5$ 알코올로 추출한 콩 추출물 또는 그 분획물을 함유하는 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 $C_1 \sim C_5$ 알코올은 메탄올, 에탄올, 이소프로필알코올, n-프로필알코올, n-부탄올 및 이소부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 $C_1 \sim C_5$ 알코올은 에탄올인 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 콩 추출물 또는 그 분획물은 아데노신을 함유하는 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 아데노신의 함량은, 콩 추출물 또는 그 분획물 중량을 기준으로, 0.01 내지 1.0 중량%인 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 콩은 서리태, 서목태, 흑태, 청태, 황태, 울타리콩, 강낭콩, 얼룩강낭콩, 적두, 거두, 콩나물콩 및 대두로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 콩은 서리태 또는 울타리콩인 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,
상기 분획물은, $C_1 \sim C_5$ 알코올 추출물에 대한 에틸아세테이트 또는 부탄올 분획물인 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 혈전 생성 억제, 혈관 수축 억제 또는 콜레스테롤 생성 억제를 통해 혈액 순환을 개선시키는 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 혈관 건강을 증진시키는 혈액 순환 개선용 조성물.
- [청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 약학 조성물.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 약학 조성물은 비만, 당뇨, 뇌졸중, 뇌출혈, 동맥경화, 협심증, 심근경색, 고혈압, 빈혈, 편두통 또는 고지혈증의 예방, 증상의 완화 또는 치료용인 약학 조성물.
- [청구항 13] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는

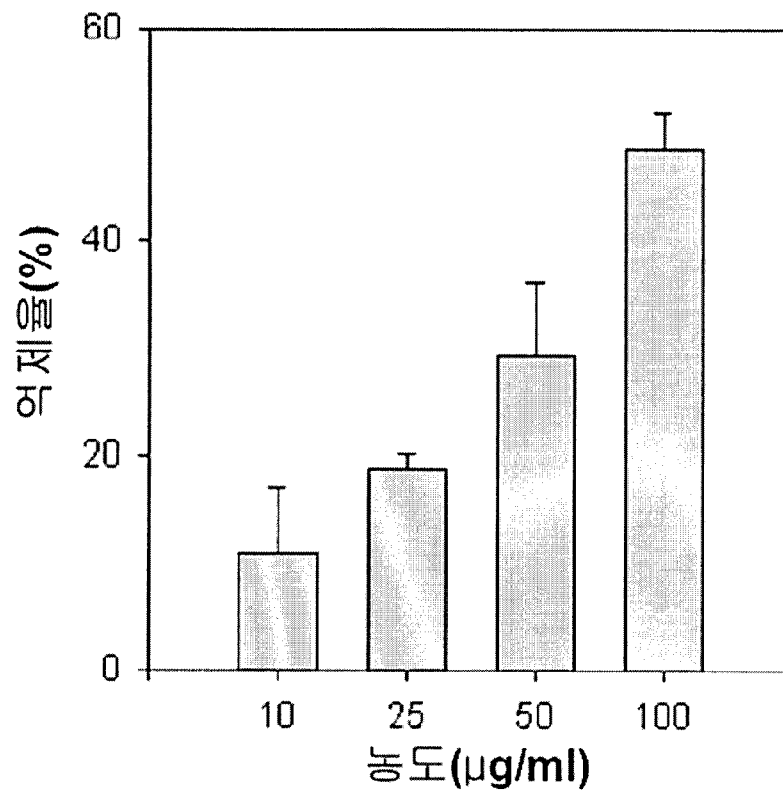
[청구항 14]

건강식품 조성물.

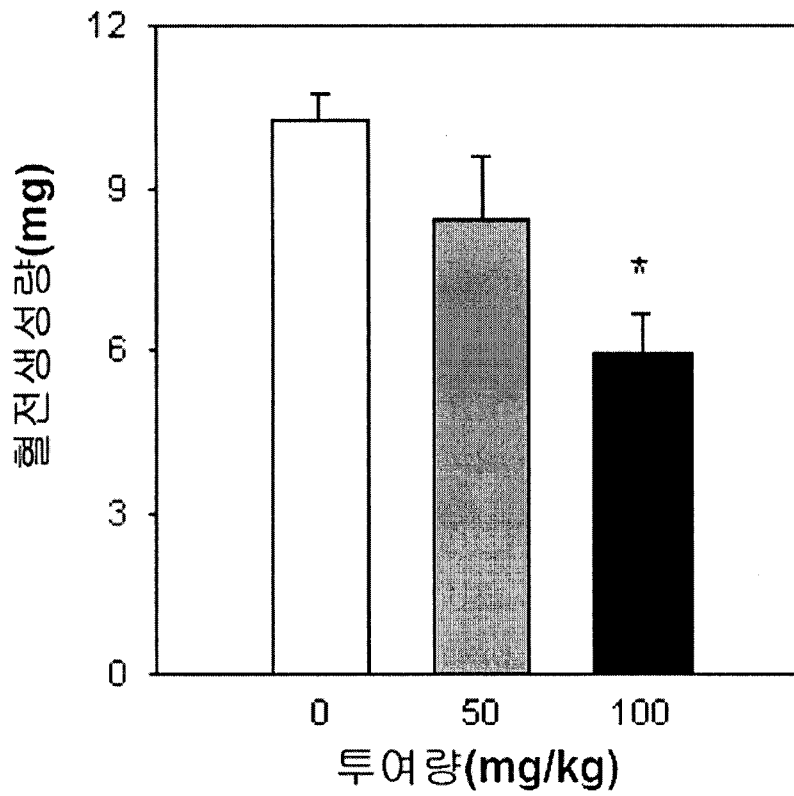
제 13 항에 있어서,

상기 건강식품 조성물은 비만, 당뇨, 뇌졸중, 뇌출혈, 동맥경화, 협심증, 심근경색, 고혈압, 빈혈, 편두통 또는 고지혈증의 예방, 증상의 완화 또는 치료용인 건강식품 조성물.

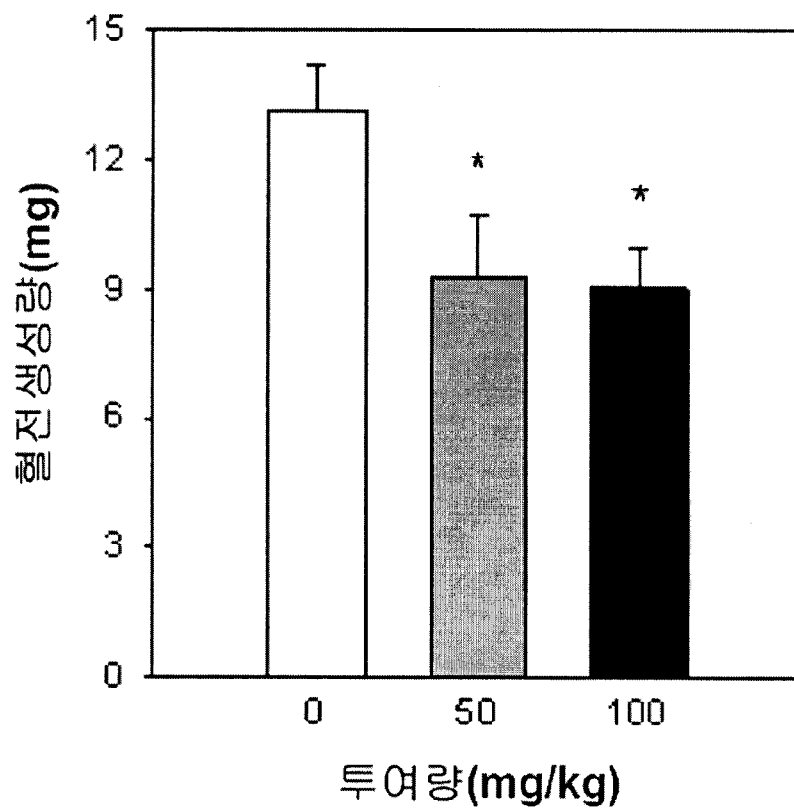
[Fig. 1]



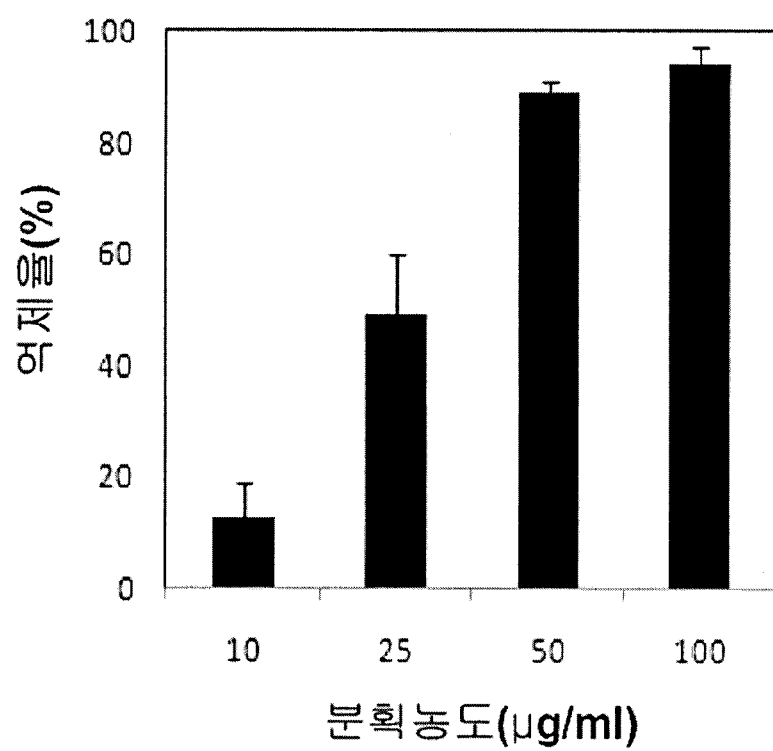
[Fig. 2]



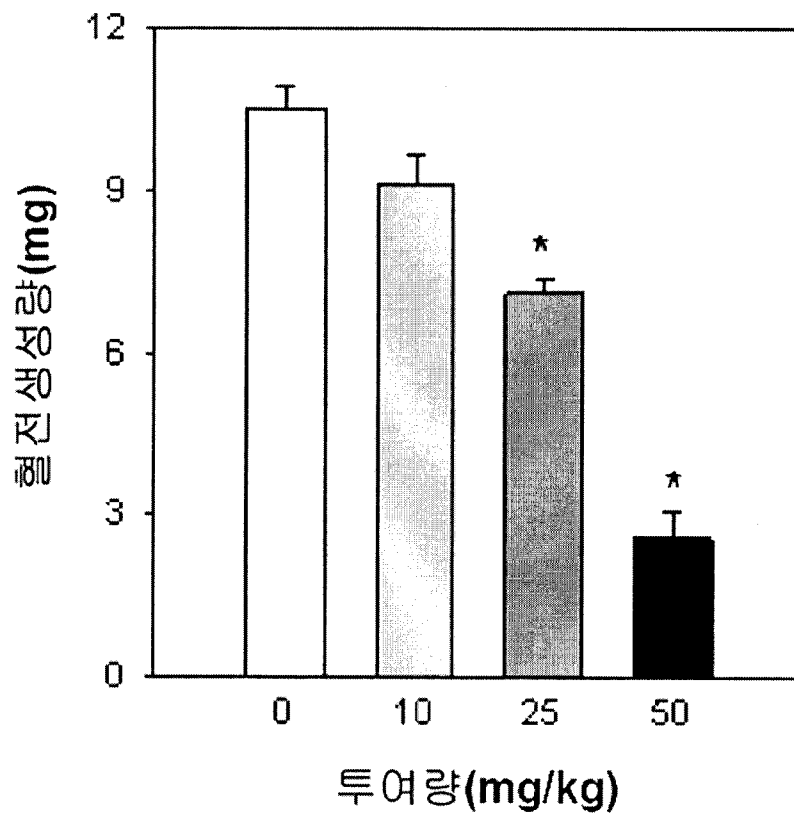
[Fig. 3]



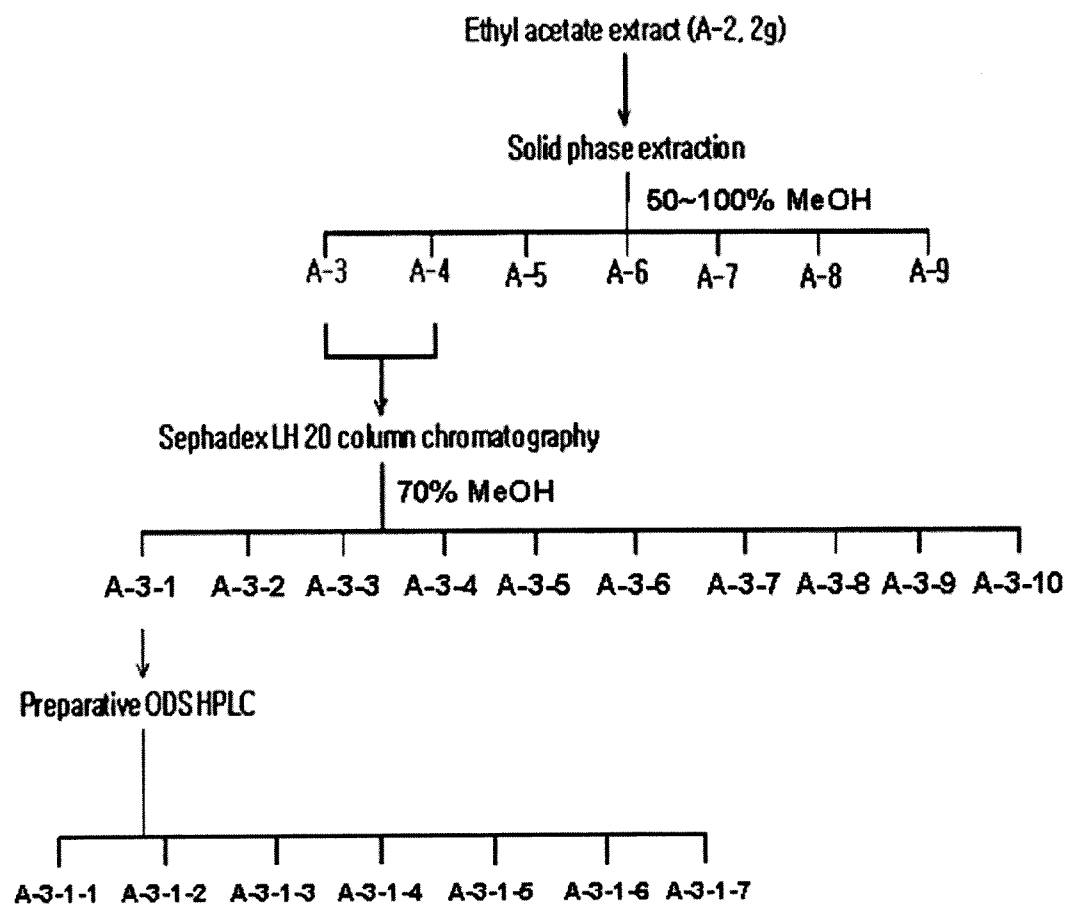
[Fig. 4]



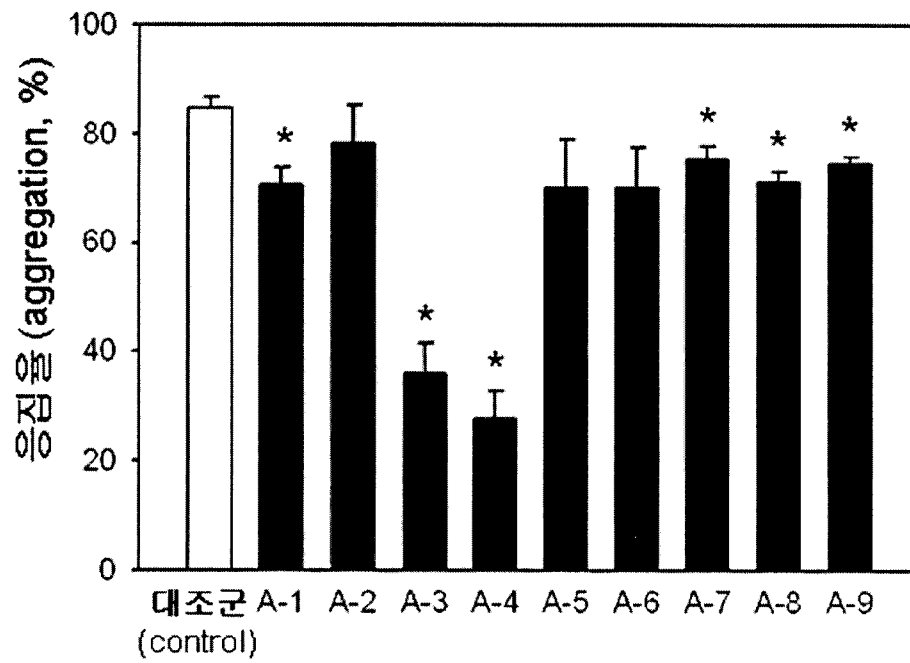
[Fig. 5]



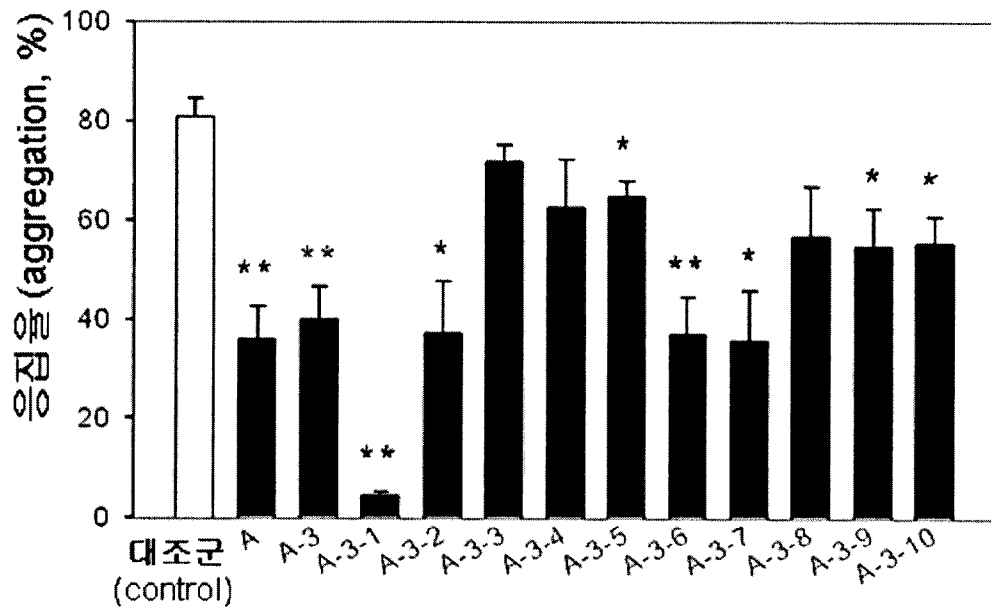
[Fig. 6]



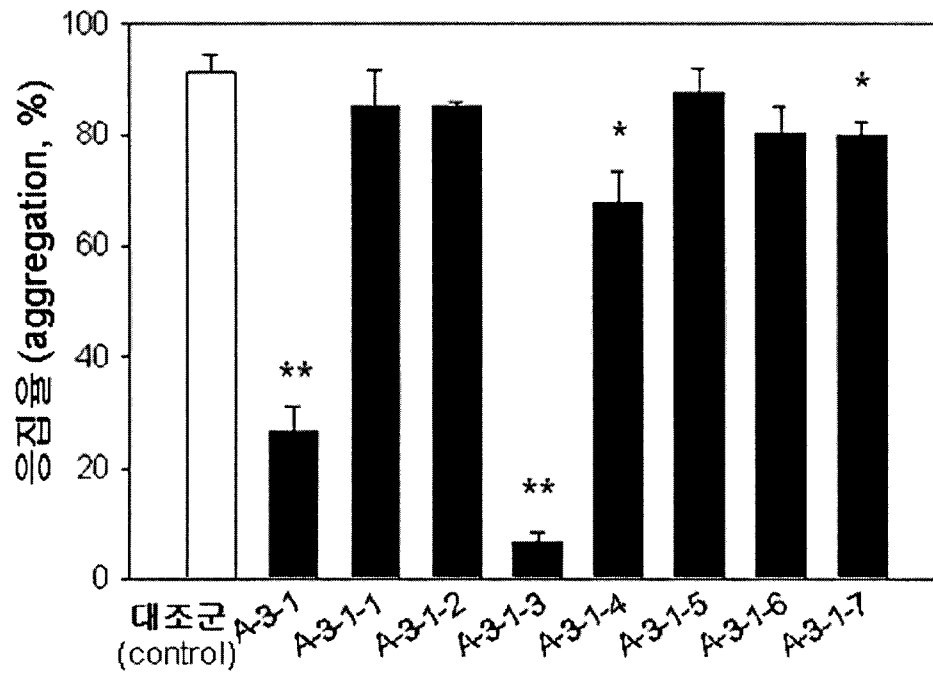
[Fig. 7]



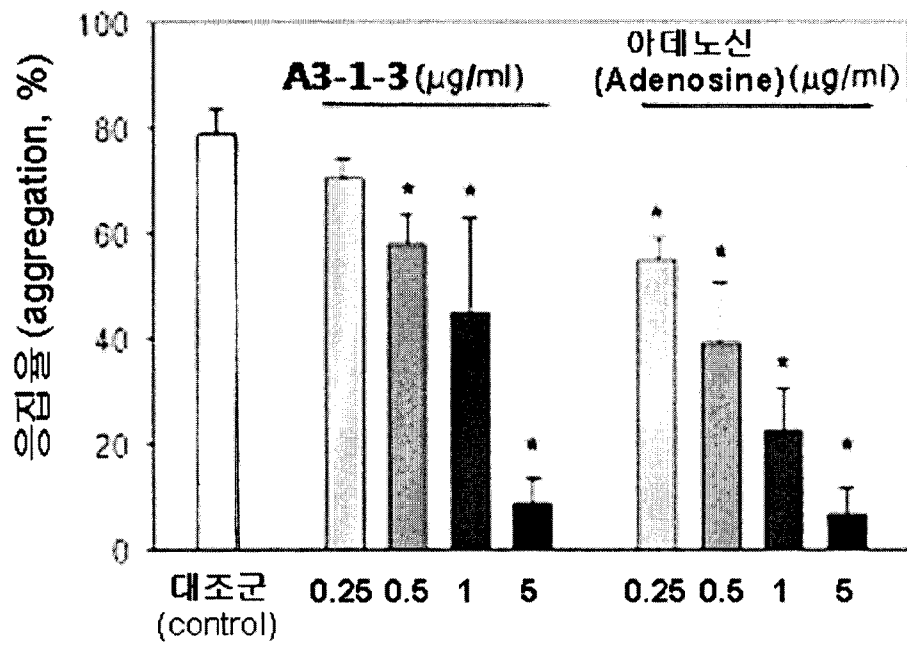
[Fig. 8]



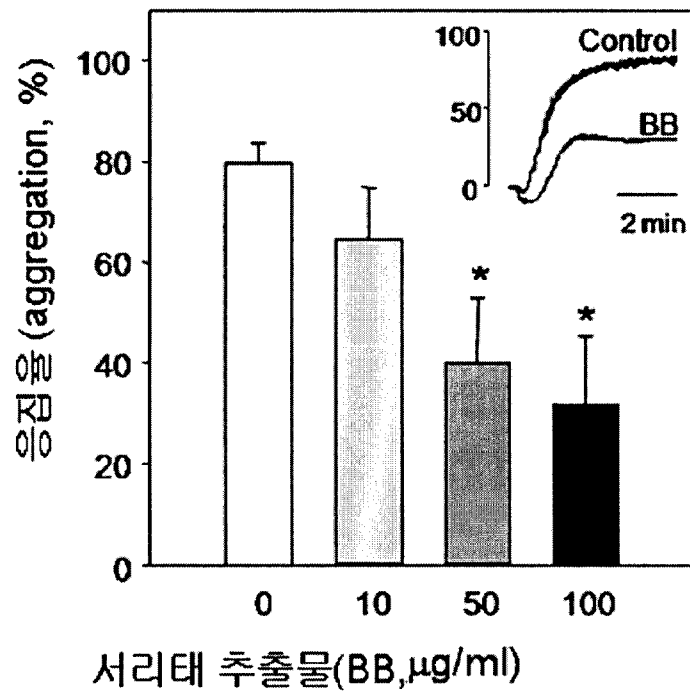
[Fig. 9]



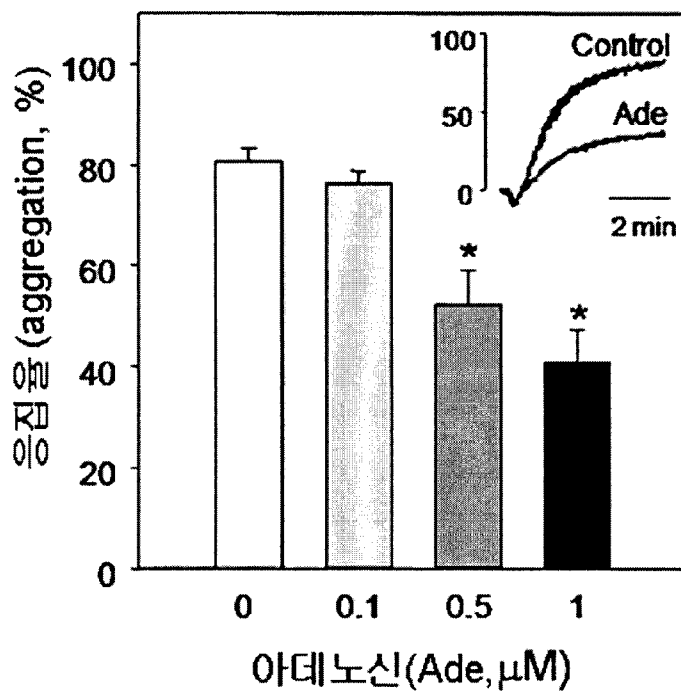
[Fig. 10]



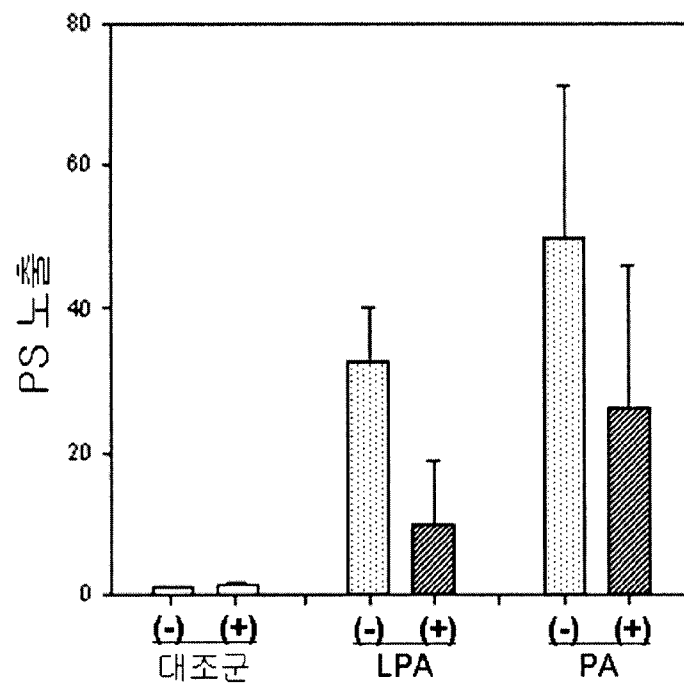
[Fig. 11]



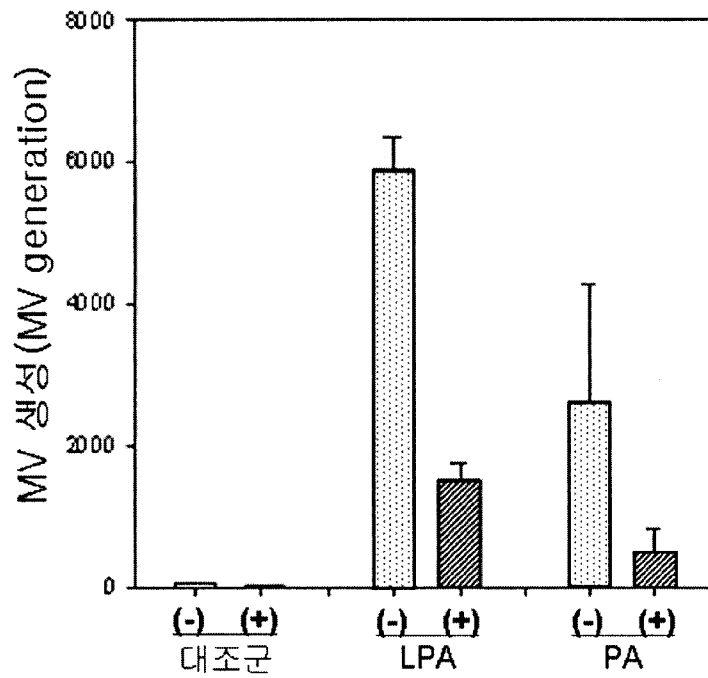
[Fig. 12]



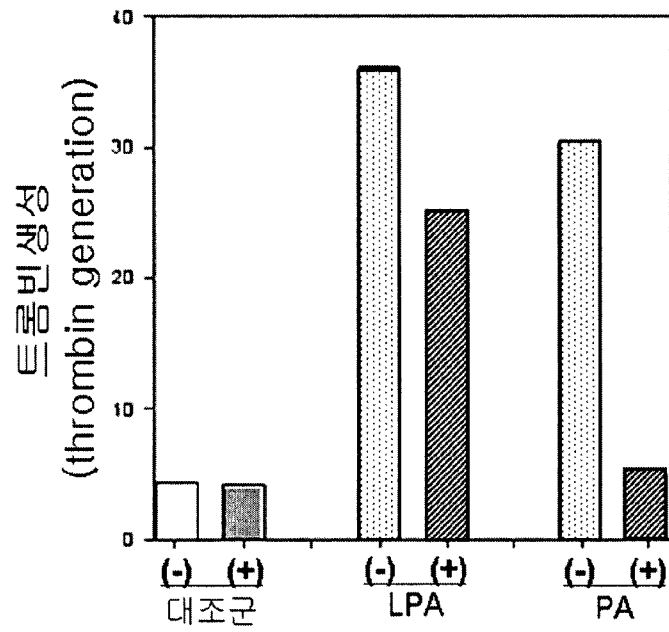
[Fig. 13]



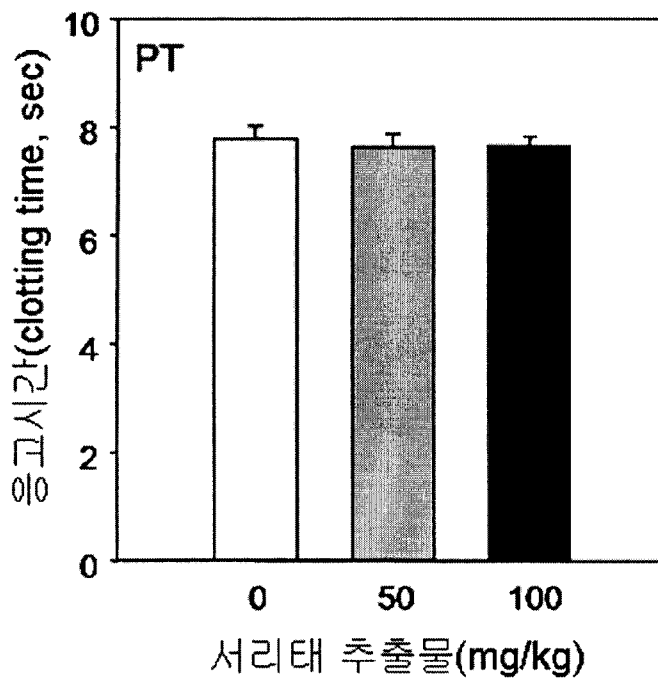
[Fig. 14]



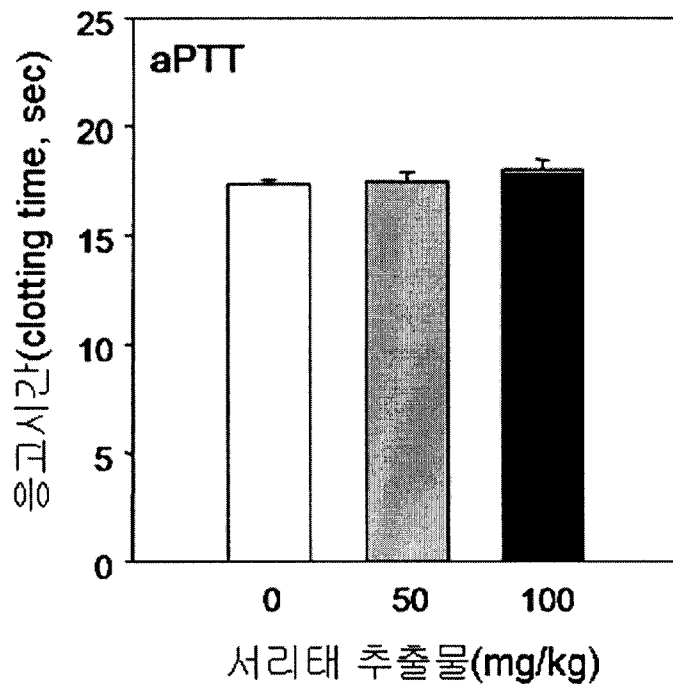
[Fig. 15]



[Fig. 16]



[Fig. 17]



[Fig. 18]

