



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0048642
(43) 공개일자 2021년05월04일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/9066 (2006.01)
 A61P 5/24 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 A23L 33/105 (2016.08)
 A61K 36/9066 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0132265
 (22) 출원일자 2019년10월23일
 심사청구일자 2019년10월23일</p> | <p>(71) 출원인
 농업회사법인 주식회사 에스디씨
 전라남도 담양군 담양읍 에코길 11-9
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 김용재
 광주 남구 효사랑길 14, 107동 907호 (봉선동, 포스코더샵아파트)
 이정민
 경기도 용인시 기흥구 흥덕3로 60, 1404동 703호 (영덕동, 흥덕마을14단지 호반베르디움)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 신동인</p> |
|---|--|

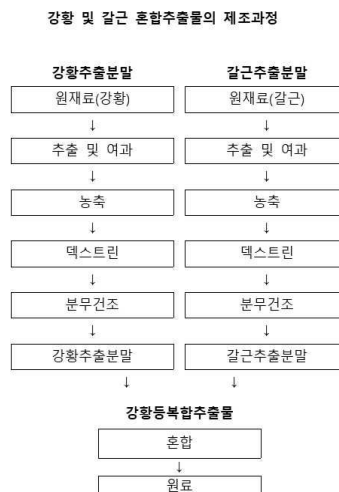
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 조성물**

(57) 요약

본 발명은 강황 및 갈근의 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 추출물은 추출물의 지표성분 정량실험(실험예 1), 조골세포와 파골세포를 이용한 강황, 갈근 개별 추출물들의 여성갱년기 생리활성 비교 평가(실험예 2), 강황, 갈근추출물들의 혼합물의 여성갱년기 생리활성 비교 평가(실험예 3), 강황, 갈근추출물들의 혼합물의 ICR 마우스를 이용한 동물 실험을 통한 여성갱년기 개선 생리활성 평가(실험예 4) 등을 통하여 여성 호르몬 조절이상 질환 치료 및 예방에 유용함을 확인하여, 본 발명의 조성물은 여성 호르몬 조절이상 질환의 치료 및 예방용 의약품, 건강기능식품, 기능성식품, 건강보조식품, 식품 첨가제 등의 조성물로 유용하게 이용될 수 있음이 확인되었다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 5/24 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/302 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)

이민희

경기도 과주시 송화로 13, 팜스프링 111동 203호

(72) 발명자

차민석

광주광역시 동구 의재로 120 한국아텔리움아파트
 102동 904호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	118036-03
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	강황, 갈근을 이용한 여성갱년기 건강기능식품 산업화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	농업회사법인(주)산들촌
연구기간	2018.04.30 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물임을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 여성 호르몬 조절이상 질환은 여성 갱년기, 성욕감퇴, 에스트로겐 저하증, 성호르몬 과다증, 또는 성조숙증임을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 4

강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 건강보조식품.

청구항 5

강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 여성 호르몬 조절이상 질환은 여성 갱년기, 성욕감퇴, 에스트로겐 저하증, 성호르몬 과다증, 또는 성조숙증임을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] [문헌 1] 한국 등록특허 10-1400913호
- [0003] [문헌 2] 한국등록특허 10-0419121호
- [0004] [문헌 3] 정보섭 외 1인, 도해향약대사전, 영림사, pp545-548, 1998년
- [0005] [문헌 4] 정보섭 외 1인, 도해향약대사전, 영림사, pp826-828, 1998년
- [0006] [문헌 5] 정보섭 외 1인, 도해향약대사전, 영림사, pp164-165, 1998년
- [0007] [문헌 6] Paech K, Webb P, Kuiper G, Differential ligand activation of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta at AP1 site. *Science*, 1997, **277**; 1508-1510
- [0008] [문헌 7] Na-Ra Han, Na-Rae Kim, Hyung-Min Kim Hyun-Ja Jeong, Cysteine prevents Menopausal syndromes in ovariectomized mouse, *Reproductive Sci*, 2016, **23**;670
- [0009] [문헌 8] Hideki Shuto, Atsushi Yamauchi, Munehiko Ikeda, Yoshio Sohda, Ayako Koga, Kohji Tominaga, Takashhi Egawa, and Yasufumi kataoka, Forced exercise-induced flushing of tail skin in ovariectomized mice, as a new experimental model of menopausal hot flushes, *J Pharmacol Sci*, 2005,98:323
- [0010] [문헌 9] Minghua Li, Chunmei Li, Wade S. Parkhouse, Age-related differences in the des IGF-I-mediated

activation of Akt-1 and p70 S6K in mouse skeletal muscle, Mechanisms of Ageing and Development, 2003, 124:771

- [0011] [문헌 10] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983, 16:55-63.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 여성 호르몬 조절이상 질환으로는, 여성 갱년기, 성욕감퇴, 에스트로겐 저하증, 성호르몬 과다증, 성조숙증 등이 있으며, 이로 인해 신경과민, 정서불안, 우울증, 현기증, 안면홍조, 발한, 수면장애, 활력저하, 기억력저하, 업무능력 감소, 체력 저하, 운동능력 감소, 체모감소, 피부노화, 골밀도 감소 및 내장지방증가와 같은 증상이 나타날 수 있다.
- [0014] 이와 같은 여성 호르몬 조절 관련 질환 또는 증상을 치료하기 위해 대표적으로 호르몬 요법이 쓰이고 있다. 그러나 호르몬 요법은 유방암, 뇌졸중, 심장마비, 정맥 혈전증, 심혈관계 질환 등의 부작용을 일으킬 수 있는 것으로 나타났다. (한국 등록특허 10-1400913호)
- [0015] 갱년기(climacteric)란 내분비 증후군의 일종으로 난소기능의 전반적이고 점진적인 감소가 일어나 생리적 기능 및 성기능이 감소 내지 소실되는 과도기를 말하며, 갱년기의 한 과정으로 난소기능의 정지 후에 일어나는 생리의 영구적인 정지인 폐경(menopause)이 오게 된다. 폐경기에는 에스트로겐 생성의 감소, 난포자극호르몬(follicular stimulating hormone, FSH) 및 황체화호르몬(luteinizing hormone, LH)의 상승 등 호르몬의 변화에 따라 급만성 증상이 나타날 수 있다. 예를 들어, 안면홍조, 빈맥, 발한, 두통 등의 혈관성 변화에 의한 증상; 근육통, 관절통, 요통 등의 근골격계 변화에 의한 증상; 빈뇨, 노실금 등의 비뇨생식기 변화에 의한 증상; 기억력 감퇴, 우울증, 집중력 감퇴, 현기증 등의 뇌신경계 변화에 의한 증상; 시력 감퇴, 피부 및 모발의 변화 등의 일반적 변화에 의한 증상을 나타내게 된다.
- [0016] 폐경 후 에스트로겐(estrogen)의 생성 장소는 난소의 기질, 부신, 피하지방이며, 안드로스테디온(androstendione)의 방향화에 의하여 에스테론(estrone)으로 전환된다. 폐경기에는 생리적으로 필요 수준 이하의 에스트로겐(estrogen) 분비 감소는 안면 홍조, 생식기 위축, 배뇨 장애, 골다공증, 지질 대사 이상, 우울증, 불면증, 피부의 노화 등 여러 증상을 일으키며, 이러한 증상을 ‘갱년기 증후군’ 이라고 한다(Han 등, Reproductive Sci, 2016, 23:670). 특히 열감(hot flush)은 발한, 홍조, 심계항진, 불안, 과민성 및 식은땀을 발생할 수 있다(Vered 등, The Lancet, 2002, 360:1851). 갱년기 증후군은 신체적 기능 저하는 물론 정신적, 사회적으로 위축을 가져 오게 된다.
- [0017] 이러한 여성의 갱년기 증상을 개선하기 위한 치료요법으로 호르몬 대체요법, 비스테로이드계 제에 의한 치료법 등이 개발되어 있으며, 그 중에 에스트로겐을 투여하는 호르몬 대체요법이 가장 효과적인 방법으로 알려져 있다. 그러나, 상기 치료요법에 따라 장기간 약물을 사용하면 자궁내막암, 유방암, 고혈압, 혈전증, 당뇨병 결석 등을 일으킬 수 있으며, 또한 월경성 출혈이 나타날 수 있고, 난소 과잉자극 등의 부작용으로 인하여 의사의 처방 없이는 복용할 수 없다는 문제점이 있다. (한국등록특허 10-0419121호)
- [0018] 현재 이러한 갱년기 장애 개선 및 치료를 위하여 많은 약물 요법들이 개발되고 있으며, 대표적으로 호르몬 대체요법이 많이 사용되고 있다. 이 호르몬 대체 요법에는 주기적 황체호르몬 병합요법(combined/sequential estrogen and progestin therapy)과 지속적 황체호르몬 병합요법(continuous/combined estrogen and progestin therapy) 및 estrogen 단독 투여 요법이 있다.
- [0019] 그러나 이러한 대체 요법은 과량의 에스트로겐으로 인하여, 자궁내막암, 심장질환을 비롯하여, 유방암의 발생 빈도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 최근에는 다소 안전한 식물성 에스트로겐(estrogen)에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다.
- [0020] 이러한 약물 요법에 의한 문제점을 극복하기 위하여 천연 생약을 주성분으로 하는 여성 갱년기 증상의 개선제의 개발이 시도되고 있다.
- [0021] 강황(薑黃 : *Curcuma longa* Linne)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 열대작물로서 다년생 숙근성(宿根性) 초본 식물로 동인도지방에서 기원전 970년경 재배가 시작되었으며, 향신료로 사용되어 왔으며 우리나라를 비롯한

동남아시아에서 재배되고 있으며, 동의보감, 대한약전, PDR for Herbal Medicines, WHO monographs on selected medicinal plants(Vol.1) 등에 질병치료에 사용되었다는 기록이 있으며, 유사 생약인 울금(*Curcuma longa* L.)은 생강과에 속하는 다년생 초목으로서 원산지는 인도, 중국 및 일본 등이고, 고온다습한 남부 아시아, 아프리카 및 중남미에서 자생하고 있으며 동인도 지방에서 재배가 시작되었다고 알려져 있다 (Ryuat al.. Applied chemistry, 9: 57-60 (2005)). 울금은 한약재, 향신료 및 식용으로, 열대지방의 남아시아와 동남 아시아에서 오랜 기간 동안 사용되어 왔는데, 울금의 가루나 추출액은 "본초강목"과 "동의보감"등의 고서나 기타 동물 실험에서 이담작용, 위액 분비 촉진 작용, 이뇨 작용, 해독 기능, 항암 작용, 항염 작용 및 항산화 작용 등이 알려져 있다 (김창렬. 식품의약품안전처, pp 1-98 (2006)). 또한, 울금의 뿌리, 줄기의 성분은 항산화와 세포보호 역할을 수행하는데, 주성분은 커큐민 (curcumin)과 커큐민(curcumin) 유도체 및 아로마틱 튜메론 (Aromatic turmerone)으로 알려져 있다(Chatterjee, S. et al, Food Research International. 32.487-490. 1999.).

[0022] 갈근(葛根; Puerariae Radix)은 콩과(Leguminosae)의 덩굴나무인 쑤(*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi.)의 뿌리로 우리나라 전역의 산기슭 양지에서 자라며, 일본, 중국에 분포하며 갈근의 성분은 푸에라린(puerarin), 다이드제인(daizein), 다이드진(daidzin) 등의 플라보노이드(flavonoid)계 화합물과 소야사포닌(soyasaponin) 등의 사포닌(saponin) 및 전분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있고 진경작용 및 해열작용을 나타낸다 (정보섭외, 도해 향약대사전, 영림사, p704-706, 1998년).

[0023] 이에 본 발명자들은 상기 시료들을 대상으로 추출물의 지표성분 정량실험(실험예 1), 조골세포와 파골세포를 이용한 강황, 갈근 개별 추출물들의 여성갱년기 생리활성 비교 평가(실험예 2), 강황, 갈근의 배합 추출물들의 여성갱년기 생리활성 비교 평가(실험예 3), 강황, 갈근 추출물의 ICR 마우스를 이용한 동물 실험을 통한 여성갱년기 개선 생리활성 평가(실험예 4) 등을 통하여 여성 호르몬 조절이상 질환 치료 및 예방에 유용함을 확인하여, 본 발명의 조성물이 여성 호르몬 조절이상 질환의 치료 및 예방용 의약품, 건강기능식품, 건강보조식품, 식품첨가제 등의 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0024] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 조성물을 제공한다.

[0025] 또한 본 발명은 강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

[0026] 또한 본 발명은 강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 건강보조식품을 제공한다.

[0027] 또한 본 발명은 강황 및 갈근의 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명은 강황 및 갈근의 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 조성물을 제공한다.

[0029] 또한 본 발명은 강황 및 갈근의 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

[0030] 또한 본 발명은 강황 및 갈근의 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 건강보조식품을 제공한다.

[0031] 또한 본 발명은 강황 및 갈근의 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] 본원에서 정의되는 여성 호르몬 조절이상 질환으로는, 여성 갱년기, 성욕감퇴, 에스트로겐 저하증, 성호르몬 과다증, 성조숙증 등을 포함하며, 이로 인해 신경과민, 정서불안, 우울증, 현기증, 열성홍조, 발한, 수면장애, 활력저하, 기억력저하, 업무능력 감소, 체력 저하, 운동능력 감소, 체모감소, 피부노화, 및 내장지방증가 등의 질환을 포함할 수 있다.

[0033] 본원에서 정의되는 "추출물"은 생약에 추출 용매, 구체적으로, 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 저급알코올 또는 주정의 혼합용매에 가용한 추

출물, 보다 바람직하게는 물 또는 물 및 에탄올 또는 주정의 혼합용매, 보다 더 바람직하게는 물 또는 5 내지 90%(w/w) 물 및 에탄올 또는 주정의 혼합용매, 가장 바람직하게는 물 또는 10 내지 80%(w/w) 물 및 에탄올 또는 주정의 혼합용매를 가하여 추출하여 얻어진 추출물뿐 아니라, 상기 추출물의 농축물 및 회석물, 및 상기 추출물, 농축물, 및 회석물의 건조물을 모두 포함하는 의미로, 특별한 언급이 없는 한, "추출물"은 생약에 추출 용매를 가하여 추출하여 얻어진 추출물, 상기 추출물의 건조물, 상기 추출물의 농축물 또는 회석물, 및 상기 농축물 또는 회석물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

[0034] 구체적으로, 본원에서 정의되는 상기 “강황 및 갈근의 조합생약”은 바람직하게는, 강황 및 갈근의 조합의 중량 혼합비(w/w)가 0.01 내지 100 : 0.01 내지 100 중량부 (w/w), 보다 바람직하게는 0.5 내지 50 : 0.5 내지 50 중량부 (w/w), 보다 더 바람직하게는 0.3 내지 30 : 0.3 내지 30 중량부, 더욱 더 바람직하게는 0.1-10 : 0.1-10 중량부로 배합된 배합물을 포함함을 특징으로 한다.

[0035] 본원에서 정의되는 “조합생약 추출물”은 (a)개개 생약의 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 **저급알코올 또는 주정**의 혼합용매에 가용한 추출물, 보다 바람직하게는 물 또는 물 및 에탄올 또는 주정의 혼합용매, 보다 더 바람직하게는 물 또는 5 내지 90%(w/w) 물 및 에탄올 또는 주정의 혼합용매, 가장 바람직하게는 물 또는 10 내지 80%(w/w) 물 및 에탄올 또는 주정의 혼합용매에 가용한 **추출물들의 조합** 또는 (b) 배합된 조합 생약의 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 **저급알코올 또는 주정**의 혼합용매에 가용한 추출물, 보다 바람직하게는 물 또는 물 및 에탄올 또는 주정의 혼합용매, 보다 더 바람직하게는 물 또는 5 내지 90%(w/w) 물 및 에탄올 또는 주정의 혼합용매, 가장 바람직하게는 물 또는 10 내지 80%(w/w) 물 및 에탄올 또는 주정의 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.

[0036] 상기 추출물의 약학조성물은 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 90 중량%로 사용이 가능하다.

[0038] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0039] 본 발명의 강황 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.

[0040] 먼저, 건조생약시료인 강황을 각각 세척 및 건조한 후에, 상기 시료 부피의 1 내지 20배 (w/v) 중량, 바람직하게는 1 내지 10배 (w/v) 중량의 물, 메탄올, 에탄올, 주정 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 또는 주정 혼합용매로 50 내지 120℃, 바람직하게는 약 60-100℃에서 1시간 내지 24시간, 바람직하게는 2시간 내지 12시간 동안 열수 추출법, 냉침 추출법 또는 초음파 추출법, 바람직하게는 열수 추출법을 수행하여 열수 추출액을 수득하는 제 1단계; 상기 1 단계에서 얻은 추출액을 여과지로 여과하여 여과물을 수득하는 제 2단계; 상기 여과물을 동결건조, 상온건조 또는 열풍건조, 바람직하게는 동결건조를 수행하여 건조상태의 생약 추출물을 수득하는 제 3단계 공정을 통하여 본 발명의 강황 추출물을 제조가능하다.

[0041] 본 발명의 조합 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.

[0042] 먼저, 건조생약시료인 강황 및 갈근을 각각 세척 및 건조한 후에, 강황 및 갈근의 조합의 중량 혼합비(w/w)가 0.01 내지 100 : 0.01 내지 100 중량부 (w/w), 보다 바람직하게는 0.5 내지 50 : 0.5 내지 50 중량부 (w/w), 보다 더 바람직하게는 0.3 내지 30 : 0.3 내지 30 중량부, 더욱 더 바람직하게는 0.1-10 : 0.1-10 중량부로 배합하는 제 1단계; 상기 배합 시료 부피의 1 내지 20배 (w/v) 중량, 바람직하게는 1 내지 10배 (w/v) 중량의 물, 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매로 50 내지 120℃, 바람직하게는 약 60-100℃에서 1시간 내지 24시간, 바람직하게는 2시간 내지 12시간 동안 열수 추출법, 냉침 추출법 또는 초음파 추출법, 바람직하게는 열수 추출법을 수행하여 열수 추출액을 수득하는 제 2단계; 상기 2 단계에서 얻은 추출액을 여과지로 여과하여 여과물을 수득하는 제 3단계; 상기 여과물을 동결건조, 상온건조 또는 열풍건조, 바람직하게는 동결건조를 수행하여 건조상태의 생약 추출물을 수득하는 제 4단계 공정을 통하여 본 발명의 혼합생약 추출물을 제조가능하다.

[0043] 따라서, 본 발명은 상기의 제조방법 및 상기 제조방법으로 강황 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 치료를 위한 약학 조성물, 건강보조식품 및 건강기능식품을 제공한다.

[0044] 따라서, 본 발명은 상기 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 복합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 치료 및 예방용 약학조성물, 건강기능식품 또는 건강보조식품을 제공한다.

[0045] 상기 제조방법으로 제조된 추출물을 대상으로 **추출물의 지표성분 정량실험(실험예 1)**, **조골세포와 파골세포를**

이용한 강황, 같은 개별 추출물들의 여성갱년기 생리활성 비교 평가(실험예 2), 강황, 같은 배합 추출물들의 여성갱년기 생리활성 비교 평가(실험예 3), 강황, 같은 추출물의 ICR 마우스를 이용한 동물 실험을 통한 여성갱년기 개선 생리활성 평가(실험예 4) 등을 통하여 여성 호르몬 조절이상 질환 치료 및 예방에 유용함을 확인하여, 본 발명의 조성물은 여성 호르몬 조절이상 질환의 치료 및 예방용 의약품, 건강기능식품, 기능성 식품, 건강보조식품, 식품 첨가제 등의 조성물로 유용하게 이용될 수 있음이 확인되었다.

- [0046] 본 발명의 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 99% 중량으로 포함된다.
- [0047] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 또한 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 외용제제에는 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 g/kg 내지 5 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내, 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 강황 및 같은 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 강황 및 같은 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선용 건강보조식품을 제공한다.
- [0054] 따라서, 또한, 본 발명은 강황 및 같은 조합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선용 식품 또는 식품첨가제를 제공한다.
- [0055] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

- [0056] 본 발명의 추출물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0057] 본 발명의 상기 추출물은 여성 호르몬 조절이상 질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 식품은 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 환자식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 추출물을 첨가하는 것도 포함된다. 본 발명의 식품 조성물은, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 추출물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량부에 대하여 0.1 내지 70 중량부, 바람직하게는 2 내지 50 중량부 첨가될 수 있다. 상기 추출물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.
- [0059] 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 또한 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0061] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.
- [0062] 본 발명의 추출물이 포함된 기능성 식품으로는 빵, 떡류, 건과류, 캔디류, 초콜릿류, 츄잉껌, 잼류와 같은 과자류 아이스크림류, 빙과류, 아이스크림 분말류와 같은 아이스크림 제품류 우유류, 저지방 우유류, 유당분해우유, 가공유류, 산양유, 발효유류, 버터유류, 농축유류, 유크림류, 버터유, 자연치즈, 가공치즈, 분유류, 유청류와 같은 유가공품류 식육가공품, 알가공품, 햄버거와 같은 식육제품류 어묵, 햄, 소세지, 베이컨 등의 어육가공품과 같은 어육제품류 라면류, 건면류, 생면류, 유당면류, 호화건면류, 개량숙면류, 냉동면류, 파스타류와 같은 면류 과실음료, 채소류음료, 탄산음료, 두유류, 요구르트 등의 유산균음료, 혼합음료와 같은 음료 간장, 된장, 고추장, 춘장, 청국장, 혼합장, 식초, 소스류, 토마토케첩, 카레, 드레싱과 같은 조미식품 마가린, 쇼트닝 및 피자를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 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 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 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, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0064] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 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. 그밖에 본 발명의 조성물들은 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 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0065]

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 추출물은 추출물의 지표성분 정량실험(실험예 1), 조골세포와 파골세포를 이용한 강황, 갈근 개별 추출물들의 여성갱년기 생리활성 비교 평가(실험예 2), 강황, 갈근의 배합 추출물들의 여성갱년기 생리활성 비교 평가(실험예 3), 강황, 갈근 추출물의 ICR 마우스를 이용한 동물 실험을 통한 여성갱년기 개선 생리활성 평가(실험예 4) 등을 통하여 여성 호르몬 조절이상 질환 치료 및 예방에 유용함을 확인되었다. 따라서 본 발명의 조성물은 여성 호르몬 조절이상 질환의 치료 및 예방용 의약품, 건강기능식품, 기능성 식품, 건강보조식품, 식품 첨가제 등의 조성물로 유용하게 이용될 수 있음이 확인되었다.

도면의 간단한 설명

[0066]

도 1은 강황 및 갈근 혼합추출물의 제조과정을 나타낸 도이며

도 2는 지표성분들의 HPLC 분석결과를 나타낸 도이며;

도 3은 파골전구세포인 RAW264.7 세포에서의 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 물추출물의 세포 생존율(cell viability)에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (테이타는 미처치 대조군 (0 $\mu\text{g/mL}$, 100%)과 비교시의 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 물추출물과 배양시의 세포 생존율을 표시하고 모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 SPSS 소프트웨어를 이용한 일원분산분석법(one-way ANOVA) 후 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주함);

도 4는 파골전구세포인 RAW264.7 세포에서의 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 20% 에탄올 추출물의 세포 생존율(cell viability)에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (테이타는 미처치 대조군 0 $\mu\text{g/mL}$, 100%)과 비교시의 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 20% 에탄올 추출물과 배양시의 세포 생존율을 표시하고 모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 SPSS 소프트웨어를 이용한 일원분산분석법(one-way ANOVA) 후 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주함);

도 5는 파골전구세포인 RAW264.7 세포에서의 강황 (*Curcuma longa*. L) 물 추출물의 세포 생존율(cell viability)에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (테이타는 미처치 대조군 0 $\mu\text{g/mL}$, 100%)과 비교시의 강황 (*Curcuma longa*. L) 물 추출물과 배양시의 세포 생존율을 표시하고 모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 SPSS 소프트웨어를 이용한 일원분산분석법(one-way ANOVA) 후 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주함);

도 6은 파골전구세포인 RAW264.7 세포에서의 강황 (*Curcuma longa*. L) 20% 에탄올 추출물의 세포 생존율(cell viability)에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (테이타는 미처치 대조군 0 $\mu\text{g/mL}$, 100%)과 비교시의 강황 (*Curcuma longa*. L) 20% 에탄올 추출물과 배양시의 세포 생존율을 표시하고 모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 SPSS 소프트웨어를 이용한 일원분산분석법(one-way ANOVA) 후 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주함);

도 7은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 SaOs-2 세포에서의 ALP 발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, PW50: *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PW100: *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, PE50: *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PE100: *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CW50: *Curcuma longa*. L water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CW100: *Curcuma longa*. L water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CE50: *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CE100: *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$ 임);

도 8은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 SaOs-2 세포에서의 OC

발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, PW50: *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PW100 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, PE50 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PE100 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CW50 : *Curcuma longa*. L water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CW100 : *Curcuma longa*. L water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CE50 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CE100 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$ 임);

도 9는 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 SaOs-2 세포에서의 NFATc-1 발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, PW50: *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PW100 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, PE50 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PE100 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CW50 : *Curcuma longa*. L water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CW100 : *Curcuma longa*. L water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CE50 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CE100 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$ 임);

도 10은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 RAW264.7 세포에서의 NFATc-1 발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, PW50: *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PW100 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, PE50 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PE100 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CW50 : *Curcuma longa*. L water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CW100 : *Curcuma longa*. L water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CE50 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CE100 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$ 임);

도 11은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 RAW264.7 세포에서의 MMP9 발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, PW50: *Pueraria lobata* Ohwi water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PW100 : *Pueraria lobata* Ohwi water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, PE50 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, PE100 : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CW50 : *Curcuma longa*. L water extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CW100 : *Curcuma longa*. L water extract 100 $\mu\text{g/mL}$, CE50 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 50 $\mu\text{g/mL}$, CE100 : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extract 100 $\mu\text{g/mL}$ 임);

도 12는 파골전구세포인 RAW264.7 세포에서의 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 물 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 물 추출물 조합의 세포 생존율(cell viability)에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (데이터는 미처리 대조군 (0 $\mu\text{g/mL}$, 100%)과 비교시의 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 물 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 물 추출물과 배양시의 세포 생존율을 표시하고 모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 SPSS 소프트웨어를 이용한 일원분산분석법(one-way ANOVA) 후 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, (A) : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 3:7; (B) : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 5:5; 및 (C) : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 7:3를 의미함);

도 13은 파골전구세포인 RAW264.7 세포에서의 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 20% EtOH 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 20% EtOH 추출물 조합의 세포 생존율(cell viability)에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (데이터는 미처리 대조군 (0 $\mu\text{g/mL}$, 100%)과 비교시의 0% EtOH 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 20% EtOH 추출물과 배양시의 세포 생존율을 표시하고 모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 SPSS 소프트웨어를 이용한 일원분산분석법(one-way ANOVA) 후 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, (A) : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L 조합 20% EtOH extracts 3:7; (B) : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L 조합 20% EtOH extracts 5:5; 및 (C) : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L 조합 20% EtOH extracts 7:3를 의미함);

lobata Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 조합 20% EtOH 7:3를 의미함);

도 14는 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 SaOs-2 세포에서의 ALP 발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, (A) 10 $\mu\text{g/mL}$, (B) 25 $\mu\text{g/mL}$ PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3를 의미함);

도 15는 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 SaOs-2 세포에서의 OC 발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, (A) 10 $\mu\text{g/mL}$, (B) 25 $\mu\text{g/mL}$ PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3를 의미함);

도 16은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 SaOs-2 세포에서의 NFATc-1 발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, (A) 10 $\mu\text{g/mL}$, (B) 25 $\mu\text{g/mL}$ PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3를 의미함);

도 17은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 SaOs-2 세포에서의 c-Fos 발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, (A) 10 $\mu\text{g/mL}$, (B) 25 $\mu\text{g/mL}$ PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3를 의미함);

도 18은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 SaOs-2 세포에서의 Cath K 발현 mRNA 에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, (A) 10 $\mu\text{g/mL}$, (B) 25 $\mu\text{g/mL}$ PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata*

Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3를 의미함);

도 19는 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 **SaOs-2** 세포에서의 **Cath K** 발현 mRNA에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, (A) 10 $\mu\text{g/mL}$, (B) 25 $\mu\text{g/mL}$ PE : *Pueraria lobata* Ohwi 20% EtOH extracts, CE : *Curcuma longa*. L 20% EtOH extracts, PECE1 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 3:7, PECE2 : *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 5:5, PECE3: *Pueraria lobata* Ohwi extracts 및 *Curcuma longa*. L extracts 7:3, PCE1: *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 3:7, PCE2 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 5:5, PCE3 : *Pueraria lobata* Ohwi 및 *Curcuma longa*. L complex 20% EtOH extracts 7:3를 의미함);

도 20은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 ICR 마우스에서의 반북독성에 미치는 영향을 나타낸 도이며;

도 21은 래트 조직의 크기 및 형상에 영향을 나타낸 도이며 (Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented 석류 열매 추출물(*Punica Granatum* Fruit Extract) 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.를 의미함);

도 22는 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 **OVX induced** 래트 조직의 **TC, TG, HDL-Chol, 및 LDL/VLDL-Chol** 혈중 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고,¹⁾ Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented 석류 열매 추출물(*Punica Granatum* Fruit Extract) 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.를 의미함);

도 23은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의**OVX induced** 래트 조직의 **estradiol**혈중 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고¹⁾ Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented 석류 열매 추출물(*Punica Granatum* Fruit Extract) 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w.를 의미함);

도 24는 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의**OVX induced** 래트 조직의 **ALP, Osteocalcin, OPG, RANKL, M-CSF** 혈중 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이며 (모든 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 $p<0.05$ 에서 통계적으로 유의적으로 간주하고

¹⁾ Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M +

ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented 석류 열매 추출물(*Punica Granatum* Fruit Extract) 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w..를 의미함);

도 25는 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 OVX induced 래트 넓적 다리뼈(femur bone)의 구조적 및 미네랄화 매개변수(mineralization parameters) 수치에 미치는 영향 및 OVX induced 래트의 정강이뼈의 Micro-CT analysis 결과(2D image)를 나타낸 도이며 ((A) BMD, (B) BV/TV, (C) Tb.T., 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 p<0.05에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, ¹⁾Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented 석류 열매 추출물(*Punica Granatum* Fruit Extract) 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w..를 의미함);

도 26은 갈근(*Pueraria lobata* Ohwi) 추출물 및 강황 (*Curcuma longa*. L) 추출물 조합의 OVX induced 래트의 OC, RANKL, Cathepsin K and MMP-9 mRNA expression 에 미치는 영향을 나타낸 도이다 ((A) OC, (B) RANKL, (C) Cathepsin K, (D) MMP-9.이고 데이터는 평균(mean)±표준 오차(standard deviation)로 표시하고 통계 분석은 던컨 다중 검증 범위시험법(Duncan's multiple range tests)으로 수행하였으며, 상이성(Differences)은 p<0.05에서 통계적으로 유의적으로 간주하고, ¹⁾Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented 석류 열매 추출물(*Punica Granatum* Fruit Extract) 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract 및 *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w..를 의미함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0068] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 개개 생약 추출물의 제조

[0070] 전남 진도군에서 재배하고 있는 강황 (*Curcuma longa* Linne)과 전북 남원시에서 채취한 갈근 (*Pueraria lobata* O.)을 이용하여 각각의 추출물을 제조하고 혼합하여 강황 등 복합추출물을 제조하였다.

1-1. 강황 추출분말의 제조

[0073] 강황 (*Curcuma longa* Linne, 전남 진도군 재배)을 식수로 세척하고 세척된 강황을 원반기(AFM-114 정수기계)를 이용하여 3~5 mm크기로 절단하였다. 절단된 강황을 건조기(SI-70S2 신일종합건조기)에서 70~90℃로 12~18시간 건조하였다. 건조된 강황을 추출기(COSMOS-700 경서이엔피)에 넣고 강황 중량 대비 10배 중량(w/w)의 증류수, 20%에탄올 을 넣고 95℃에서 5시간 추출하였다. 상기 추출액을 100 mesh 여과망을 이용하여 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 농축기(COSMOS-700 경서이엔피)에 넣고 20 brix로 농축하였다. 농축된 농축액(표 1 참조)에 고형분 대비 20% 텍스트린을 넣고 혼합한 후 분무 건조하여 하기 실험예 시료에 사용하였다.

표 1

시료 수율 및 명명

연번	시료	추출용매	수율(%)	명명
1	강황	증류수	15.1	CW
2	강황	20% 에탄올(w/w)	14.2	CE

1-2. 갈근 추출분말의 제조

갈근 (*Pueraria lobata* O., 전북 남원시 재배)을 식수로 세척하고 세척된 갈근을 직각기름(AFM-012 정유기계) 이용하여 10~15 mm크기로 절단하였다. 절단된 갈근을 건조기(SI-70S2 신일종합건조기)에서 70~90℃로 24~48시간 건조하였다. 건조된 갈근을 추출기(COSMOS-700 경서이엔피)에 넣고 갈근 중량 대비 10배 중량(w/w)의 증류수, 20%에탄올을 넣고 95℃에서 5시간 추출하였다. 상기 추출액을 100 mesh 여과망을 이용하여 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 농축기(COSMOS-700 경서이엔피)에 넣고 20 brix로 농축하였다. 농축된 농축액(표 2 참조)에 고형 분 대비 20% 텍스트린을 넣고 혼합한 후 분무 건조하여 하기 실험에 시료에 사용하였다.

표 2

갈근시료 수율 및 명명

연번	시료	추출용매	수율(%)	명명
1	갈근	증류수	23.0	PW
2	갈근	20% 에탄올(w/w)	22.4	PE

실시예 2 복합 생약 추출물의 제조(도 1 참조)

전남 진도군에서 재배하고 있는 강황 (*Curcuma longa* Linne)과 전북 남원시에서 채취한 갈근 (*Pueraria lobata* O.)을 이용하여 실시예 1에서 얻은 건조 강황 및 갈근을 표 3의 일정 배합비로 배합하여 배합된 시료들을 혼합기(더블콘믹서 성장기계)에 넣고 혼합하여 생약조합의 추출물 PECE1, PECE2, PECE3를 각각 얻어 이들을 하기 실험에 시료에 사용하였다.

표 3

배합 시료 수율 및 명명

연번	시료	명명
1	갈근 20% 에탄올 추출물 : 강황 20% 에탄올 추출물=3:7	PECE1
2	갈근 20% 에탄올 추출물 : 강황 20% 에탄올 추출물=5:5	PECE2
3	갈근 20% 에탄올 추출물 : 강황 20% 에탄올 추출물=7:3	PECE3

실험예 1. 추출물의 지표성분 정량

하기와 같은 조건 및 과정으로 강황 및 갈근의 지표성분을 정량분석하였다.

1-1. 강황 지표성분인 쿠르쿠민(Curcumin)의 시험법

- 지표성분명 : 쿠르쿠민(Curcumin)
- 지표성분의 함량기준 : 0.6 mg/g
- 표준품 정보 : 쿠르쿠민(Curcumin) (Sigma, 08511-10 mg, assay: ≥99.0%(HPLC))
- 분석법
- (1) 시험용액의 제조
- 시료 약 1 g을 취한 후 50 mL 부피플라스크에 넣는다.(20 mg/mL)

- [0091] - 50 mL의 MeOH을 가한다.
- [0092] - 초음파진탕기(Powersonic 410 화신)에서 충분히 녹인 후 상온에서 식힌다.
- [0093] - 상기용액을 부피플라스크에 넣고 MeOH로 표선까지 맞춘 후 0.45 μ m PTFE filter(25HP045AN ADVANTEC)로 여과하여 시험용액으로 한다.
- [0094] (2) 표준용액의 제조
- [0095] - 표준물질 적정량을 MeOH으로 용해하여 1.0 mg/mL가 되게 녹여 표준원액으로 한다.
- [0096] - 상기 용액을 진탕하여 녹인 후 MeOH로 희석하여 표준용액으로 한다.
- [0097] (3) 시험용액의 제조
- [0098] 검액 및 표준액 10 μ L씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법(HPLC)에 따라 시험하여 각각의 액의 Curcumin의 피크면적 AT 및 AS를 측정한다.
- [0099] (4) 기기조건
- [0100] - 검 출 기 : PDA Detactor (측정파장 425 nm)
- [0101] - 칼 럼 : Agilent-ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm, 5 μ m)
- [0102] 또는 이와 동등한 것
- [0103] - 칼럼온도 : 35 $^{\circ}$ C
- [0104] - 유 속 : 1 mL/min
- [0105] - 주 입 량 : 10 μ L
- [0106] - 이 동 상 : 2% Acetic acid (45% ACN)
- [0107] (5) 하기 수학적 식 1로 실험결과를 계산하였다.

수학적 식 1

- [0108]
$$\text{Curcumin content (mg} \cdot \text{g}^{-1}) = S \times (A \times B) / \text{Sample(mg)} \times 100$$
- [0109] A : 시험용액의 전량 (mL)
- [0110] B : 시료용액의 희석배수
- [0111] S : 시험용액중의 Curcumin 검량선 농도 (ug/mL)

[0113] 1-2. 갈근의 지표성분인 푸에라린(Puerarin)의 시험법

- [0114] - 지표성분명 : 푸에라린(Puerarin)
- [0115] - 지표성분의 함량기준 : 70 mg/g
- [0116] - 표준품 정보 : Puerarin (Sigma, P5555-100 mg, assay: $\geq$ 98.0%(HPLC))
- [0117] - 분석법
- [0118] (1) 시험용액의 제조
- [0119] - 검체 1 g을 정밀하게 달아 100 mL 용량 플라스크에 취해 Methanol 100 mL로 정용하여 2시간 초음파 추출(Powersonic 410 화신)을 한다.
- [0120] - 이를 식힌 후 정용하여 0.45 μ m PTFE filter(25HP045AN ADVANTEC)로 여과하고, 여액을 검액으로 한다.
- [0121] (2) 표준용액의 제조

- [0122] - 표준품 Puerarin 10 mg을 취하여 10 mL 용량플라스크에 넣고, Methanol로 충분히 녹인 후 정용하여 1,000 ppm 표준원액을 제조한다.
- [0123] - 표준원액을 희석하여 표준용액으로 한다.
- [0124] (3) 시험용액의 제조
- [0125] 검액 및 표준액 10 μ L씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 Puerarin의 피크면적 AT 및 AS를 측정한다.
- [0126] (4) 기기조건
- [0127] - 검 출 기 : PDA Detector (측정과장 254 nm)
- [0128] - 칼 럼 : Shiseido Capell pak MGII (4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm, 5 μ m)
- [0129] - 칼럼온도 : 30 $^{\circ}$ C
- [0130] - 유 속 : 1 ml/min
- [0131] - 주 입 량 : 10 μ L
- [0132] - 이 동 상 : A - ACN / B - DW (A : B = 10 : 90)
- [0133] (5) 하기 수학적 2로 실험결과를 계산하였다.

수학적 2

[0134]
$$\text{Puerarin content (mg} \cdot \text{g}^{-1}) = S \times (A \times B) / \text{Sample (mg)} \times 100$$

[0135] A : 시험용액의 전량 (mL)

[0136] B : 시료용액의 희석배수

[0137] S : 시험용액중의 Puerarin 검량선 농도 (ug/mL)

1-3. 상기 실험 결과

[0140] :하기 표 4 및 도 2에 기재된 바와 같이, 강황의 지표성분인 쿠르쿠민(Curcumin)의 평균 함량은 0.604 (mg/g)이며 갈근의 지표성분인 푸에라린(Puerarin)의 평균 함량은 69.35 (mg/g)임을 확인하였다.

표 4

[0141] 강황등 복합 추출물 지표성분 분석결과

Lot No.	1 (Lot CP-001)		2 (Lot CP-002)		3 (Lot CP-003)		평균	
반복수	Curcumin (mg/g)	Puerarin (mg/g)	Curcumin (mg/g)	Puerarin (mg/g)	Curcumin (mg/g)	Puerarin (mg/g)	Curcumin (mg/g)	Puerarin (mg/g)
1반복	0.603	69.70	0.606	69.50	0.604	69.46	0.604	69.35
2반복	0.608	68.63	0.608	69.94	0.608	69.51		
3반복	0.597	69.64	0.606	69.95	0.605	69.29		
4반복	0.597	69.51	0.604	69.86	0.607	69.20		
평균	0.601	69.37	0.606	69.31	0.606	69.37	0.604	69.35

[0142] 실험예 2. 여성갱년기 생리활성 비교 평가(강황, 갈근 개별 추출물)

2-1. 실험 및 방법

[0144] (1) 조골세포와 파골세포의 기본배양 및 분화

[0145] SaOs-2 조골전구세포(HTB-85)와 RAW 264.7 파골전구세포(TIB-71)는 ATCC (walkersville, MD, USA)에서 분양받았으며, High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, SH30243), Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)에 10% fetal bovine serum (SH30084.03), Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (SV30010), Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L L-glutamine (SH30034.01), Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA)을 포함하여 사용하였다.

[0146] 상기 세포들을 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. SaOs-2 조골 전구세포의 분화는 이들 세포가 단층을 형성한 후에 50 µg/mL ascorbic acid(A5960, Sigma)와 10 mM β-glycerophosphate(G9422, Sigma) 처리에 의해 유도하였다. RAW 264.7 세포의 파골세포로의 분화는 30 ng/mL recombinant murine RANKL (R0525, Sigma)처리에 의해 유도하였다.

[0147]

[0148] (2) 세포 독성 실험 (MTT assay)

[0149] 상기 실시예 시료들의 파골세포에 독성을 나타내는지 측정하기 위하여 문헌에 기재된 MTT assay를 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.(Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983, 16:55-63.)

[0150] MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay 검사법을 이용하여 실시하였다. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다. 세포가 많이 살아있을수록 MTT로 환원이 많이 되어 더 진한 보라색을 띠게 된다.

[0152] 실험 과정

[0153] MTT solution((M5655, Sigma, 5 mg/mL)은 PBS에 녹인 뒤 여과하여 사용하였다. 파골전구세포인 RAW264.7 세포를 96 well plate에 1X10⁴ cells/well로 총 용적을 100 µL이 되도록 분주하였으며, 배양액은 10% FBS를 함유한 DMEM을 사용하였다.

[0154] 12시간 동안 세포를 배양한 후 추출물들을 25, 50, 75, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다.

[0155] 그 후, MTT solution 20 µL를 첨가하여 빛에 의한 MTT 환원을 최소화하기 위해서 호일로 빛을 차단하고 4시간 동안 반응시켰다.

[0156] 배양액과 MTT reagent를 suction하고 PBS 용액으로 2회 세척한 후, 각 well 당 DMSO 200 µL를 첨가하여 배양기에서 용해시켰으며, 20분 후 판독기 (iMARKTM Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 이용하여 560 nm 파장에서 광학 밀도(optical density)를 측정하였다.

[0158] 실험 결과 (농도설정실험)

[0159] 시료(Sample)의 적정농도를 결정하기 위해 용해도 실험을 거친 후에 RAW264.7 세포를 이용하여 세포의 생존율을 측정한 결과는 도 3, 도 4, 도 5, 도 6에 나타내었다.

[0160] 같은 물 추출물을 0-1000 µg/mL을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 25-400 µg/mL 농도에서는 생존율이 90% 이상이었으나, 600 µg/mL은 생존율이 85.5%, 800 µg/mL에서는 생존율이 82.1%, 1000 µg/mL에서는 생존율이 73.9%로 떨어진 것을 확인하였다. (도 3)

[0161] 같은 20% 에탄올 추출물을 0-1000 µg/mL을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 25-400 µg/mL 농도에서는 생존율이 90% 이상이었으나, 600 µg/mL은 생존율이 87.8%, 800 µg/mL에서는 생존율이 79.1%, 1000 µg/mL에서는 생존율이 67.4%로 떨어진 것을 확인하였다.(도 4)

[0162] 강황 물 추출물을 0-1000 µg/mL을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 25-100 µg/mL 농도에서는 생존율이 90%

이상이었으나, 200 $\mu\text{g/mL}$ 은 생존율이 84.8%, 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 80.5%, 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 70.5%, 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 67.0%, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 60.8%로 떨어진 것을 확인하였다. (도 5)

[0163] 강황 20% 에탄올 추출물을 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 25-100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 생존율이 90% 이상이었으나, 200 $\mu\text{g/mL}$ 은 생존율이 66.9%, 400 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 46.3%, 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 43.4%, 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 47.1%, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 생존율이 51.9%로 떨어진 것을 확인하였다. (도 6)

[0164] MTT 실험 진행 결과에 따라 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 세포에 처리한 후 유전자 발현 실험을 진행하였다.

[0166] (3) Real-time polymerase chain reaction에 의한 조골세포에서 파골세포 분화 관련 인자 발현 측정

[0167] 추출물을 처리하였을 때 조골세포 및 파골세포 분화 관련 인자 발현을 알아보기 위해 real time PCR을 실시하였다.

[0168] 5×10^3 개의 SaOs-2 세포를 6 well plate에 분주하고 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid와 10 mM β -glycerophosphate를 첨가하여 조골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48시간 동안 처리한 뒤, 세포를 수집하였고, 1×10^5 개의 RAW264.7 세포를 6 well plate에 분주하고 10 ng/mL RANKL과 10 ng/mL M-CSF를 첨가하여 파골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48시간 동안 처리한 뒤 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit (Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출하였다.

[0169] 키트(iScript cDNA synthesis kit Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[0170] 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR (CFX Connect™ real-time PCR detection system, Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 사용하였다.

[0171] 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 하기 표 5에 나타내었다. Real time PCR 반응은 총 20 μL 내에 cDNA 2 μL 와 2X SYBR mix 10 μL , forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μL 를 1 μL 씩 첨가하였고, 나머지는 H_2O 로 채워주었다.

[0172] PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였다. Hot start를 위해 95℃에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95℃에서 15초, annealing을 55℃에서 30초, extension을 72℃에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve를 분석하였다. 결과의 분석은 BioRad에서 제공하는 프로그램(CFX Manager™ Software, Bio-Rad Laboratories, Inc.)로 분석하였다.

표 5

[0173] Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences		SEQ. ID
GAPDH	Forward	5' -ATGGAATCCCATCACCATCTT-3'	1
	Reverse	5' -CGCCCCACTTGATTTTGG-3'	2
ALP	Forward	5' -CCGCTTTAACCAGTGCAACA-3'	3
	Reverse	5' -CCCGATTATCACGGAGATG-3'	4
Osteocalcin	Forward	5'-CAGGAGGGCAGCGAGGTA-3'	5
	Reverse	5'-GCTCCAGCCATTGATACA-3'	6
NFATC1	Forward	5' -CCTGGAGATCCCGTTGCTT-3'	7
	Reverse	5' -AGGATCCCAGCACAGTCGA-3'	8
c-fos	Forward	5' -GAGACCCCTAAGATCCCAAA-3'	9
	Reverse	5' -AACCCCGTCTTGGCATAC-3'	10
MMP9	Forward	5'-ACGCCACGCATTTTCAAAA-3'	11
	Reverse	5'-GGCCATTCCCTCCACAT-3'	12

[0175] **통계처리**

[0176] 본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

[0178] **실험 결과**

[0179] **(1) Osteoblast 관련 유전자 발현량 측정**

[0180] 염기성 인산분해 효소(alkaline phosphatase; ALP)는 대부분의 조직에 존재하며, 골 조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다.

[0181] SaOs-2 세포에 갈근, 강황 추출물을 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 ALP mRNA 발현을 측정한 결과를 도 7에 나타내었다. Ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control 군에 비해 2.9배 유의적으로 증가함을 확인하였고,

[0182] 갈근 물 추출물 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 normal control 군에 비해 각각 1.2배, 0.8배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 갈근 에탄올 추출물 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 normal control군에 비해 각각 0.9배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

[0183] 강황 물 추출물 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 normal control 군에 비해 각각 0.8배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한, 강황 에탄올 추출물 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 normal control군에 비해 1.7배 유의적으로 증가하였고, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 1.0배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 추출물 처리 후 ALP의 증가확인 결과 물 추출물보다는 에탄올 추출물에서 효과가 뛰어난 것으로 보여진다. (도 7)

[0185] Osteocalcin은 calcium과 결합하는 vitamin K 의존성 α -carboxy glutamic acid 단백질이고, 뼈의 대표적인 무기질인 수산화인회석과도 결합하며 뼈와 dentin에 매우 특이한 단백질이다.

[0186] SaOs-2 세포에 갈근, 강황 추출물을 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 osteocalcin mRNA 발현을 측정한 결과를 도 8에 나타내었다. Ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control 군에 비해 2.0배 유의적으로 증가함을 확인하였고, 갈근 물 추출물 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 normal control 군에 비해 각각 1.0배, 1.1배 증가하였다. 갈근 20% 에탄올 추출물 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 normal control군에 비해 각각 0.8배, 1.0배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 강황 물 추출물 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 normal control군에 비해 각각 0.8배 증가하였다. 또한 강황 20% 에탄올 추출물 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 normal control군에 비해 5.0배 유의적으로 증가하였고, 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리군은 0.5배 증가하였다. 추출물 처리 후 osteocalcin의 증가를 확인한 결과, 물 추출물보다는 20% 에탄올 추출물에서 효과가 뛰어난 것으로 보여진다. (도 8)

[0188] **(3) Osteoclast 관련 유전자 발현량 측정**

[0189] NFATc1과 c-Fos는 파골세포의 분화에 가장 핵심적인 요소로 파골전구세포인 RAW264.7세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화 유도에 있어서 갈근, 강황 추출물을 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 NFATc1과 c-Fos mRNA 발현을 측정한 결과를 도 9, 도 10에 나타내었다.

[0190] NFATc1 유전자 발현량을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control 군에 비해 1.7배 높게 발현되었음을 확인하였고, PW50, PW100, PE50, PE100 처리 시 control 군에 비해 NFATc1의 발현이 각각 0.4배, 0.5배, 0.5배, 0.5배 유의적으로 감소하였고, CW50, CW100, CE50, CE100 처리 시 각각 0.5배, 1.0배, 0.5배, 0.5배 유의적으로 감소하였다.

[0191] c-Fos 유전자 발현량을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control 군은 normal control군에 비해 1.8배 높게 발현되었음을 확인하였고, PW50, PW100, PE50, PE100 처리

시 control 군에 비해 NFATc1의 발현이 각각 0.6배, 0.6배, 0.5배, 0.5배 유의적으로 감소하였고, CW50, CW100, CE50, CE100 처리 시 각각 0.6배, 1.0배, 0.6배, 0.6배 유의적으로 감소하였다. (도 10)

[0193] MMP-9은 Type IV의 collagenase로 파골세포에서의 과발현은 cetracellular matrix을 분해하는 것으로 파골전구 세포인 RAW264.7세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화 유도에 있어서 갈근, 강황 추출물을 50, 100 μ g/mL을 처리한 후 MMP9 mRNA 발현을 측정된 결과를 도 11에 나타내었다.

[0194] MMP-9 유전자 발현량을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control 군은 normal control 군에 비해 3.4배 높게 발현되었음을 확인하였고, PW50, PE50 처리 시 control군에 비해 MMP-9의 발현이 각각 0.7배, 0.5배 감소하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 PW100, PE100 처리 시 control군에 비해 MMP-9의 발현이 각각 1.2배, 1.5배 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. CW50, CW100, CE50, CE100 처리 시 각각 2.9배, 9.3배, 2.4배, 2.7배 유의적으로 높게 나타났다. (도 11)

[0196] 이와 같은 결과를 토대로 하였을 때 갈근 및 강황의 물 추출물보다 20% 에탄올 추출물이 골에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료되며, 20% 에탄올 추출물을 이용하여 갈근 및 강황의 복합물 또는 복합 추출물이 골에 미치는 영향을 알아보기로 하였다.

[0198] 실험예 3. 여성갱년기 생리활성 비교 평가(강황, 갈근 복합 추출물)

[0199] 3-1. 실험 및 방법

[0200] (1) 조골세포와 파골세포의 기본배양 및 분화

[0201] SaOs-2 조골전구세포(HTB-85)와 RAW 264.7 파골전구세포(TIB-71)는 ATCC (walkersville, MD, USA)에서 분양받았으며, High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, SH30243), Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)에 10% fetal bovine serum (SH30084.03), Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (SV30010), Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L L-glutamine (SH30034.01), Hyclone laboratories, Logan, Utah, USA)을 포함하여 사용하였다.

[0202] 상기 세포들을 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. SaOS-2 조골 전구세포의 분화는 이들 세포가 단층을 형성한 후에 50 μ g/mL ascorbic acid(A5960, Sigma)와 10 mM β -glycerophosphate(G9422, Sigma) 처리에 의해 유도하였다. RAW 264.7 세포의 파골세포로의 분화는 30 ng/mL recombinant murine RANKL (R0525, Sigma)처리에 의해 유도하였다.

[0203]

[0204] (2) 세포 독성 실험 (MTT assay)

[0205] 상기 실시예 시료들의 파골세포에 독성을 나타내는지 측정하기 위하여 문헌에 기재된 MTT assay를 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.(Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983, 16:55-63.)

[0206] MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay 검사법을 이용하여 실시하였다. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다. 세포가 많이 살아있을수록 MTT로 환원이 많이 되어 더 진한 보라색을 띠게 된다.

[0208] 실험 과정

[0209] MTT solution((M5655, Sigma, 5 mg/mL)은 PBS에 녹인 뒤 여과하여 사용하였다. 파골전구세포인 RAW264.7 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 총 용적을 100 μ L이 되도록 분주하였으며, 배양액은 10% FBS를 함유한 DMEM을 사용하였다.

- [0210] 12시간 동안 세포를 배양한 후 추출물들을 25, 50, 75, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다.
- [0211] 그 후, MTT solution 20 μL 를 첨가하여 빛에 의한 MTT 환원을 최소화하기 위해서 호일로 빛을 차단하고 4시간 동안 반응시켰다.
- [0212] 배양액과 MTT reagent를 suction하고 PBS 용액으로 2회 세척한 후, 각 well 당 DMSO 200 μL 를 첨가하여 배양 기에서 용해시켰으며, 20분 후 판독기 (iMARKTM Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 이용하여 560 nm 파장에서 광학 밀도(optical density)를 측정하였다.
- [0214] **3) Real-time polymerase chain reaction에 의한 조골세포에서 파골세포 분화 관련 인자 발현 측정**
- [0215] 추출물을 처리하였을 때 조골세포 및 파골세포 분화 관련 인자 발현을 알아보기 위해 real time PCR을 실시하였다.
- [0216] 5×10^3 개의 SaOs-2 세포를 6 well plate에 분주하고 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid와 10 mM β -glycerophosphate를 첨가하여 조골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48시간 동안 처리한 뒤, 세포를 수집하였고, 1×10^5 개의 RAW264.7 세포를 6 well plate에 분주하고 10 ng/mL RANKL과 10 ng/mL M-CSF를 첨가하여 파골세포로의 분화를 유도 후 추출물을 48시간 동안 처리한 뒤 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit (Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출하였다.
- [0217] 키트(iScript cDNA synthesis kit Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다.
- [0218] 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR (CFX ConnectTM real-time PCR detection system, Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 사용하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 표 6에 나타내었다. Real time PCR 반응은 총 20 μL 내에 cDNA 2 μL 와 2X SYBR mix 10 μL , forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μL 를 1 μL 씩 첨가하였고, 나머지는 H_2O 로 채워주었다. PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였다. Hot start를 위해 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초, annealing을 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, extension을 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve를 분석하였다. 결과의 분석은 BioRad에서 제공하는 CFX MaestroTM Analysis Software로 분석하였다.

표 6

[0219] Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences		SEQ.ID
GAPDH	Forward	5' -ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3'	1
	Reverse	5' -CGCCCCACTTGATTTTGG-3'	2
ALP	Forward	5' -CCGCTTTAACCAGTGCAACA-3'	3
	Reverse	5' -CCCGATTCATCAGGAGATG-3'	4
Osteocalcin	Forward	5' -CAGGAGGGCAGCGAGGTA-3'	5
	Reverse	5' -GCTCCCAGCCATTGATACA-3'	6
NFATC1	Forward	5' -CCTGGAGATCCCGTTGCTT-3'	7
	Reverse	5' -AGGATCCAGCAGTCGA-3'	8
c-fos	Forward	5' -GAGACCCCTAAGATCCCAAA-3'	9
	Reverse	5' -AACCCCGTCTTGGCATAC-3'	10
MMP9	Forward	5' -ACGCCACGATTTTCAAAA-3'	11
	Reverse	5' -GGCCATTCCCTCCACAT-3'	12
Cathepsin K	Forward	5' -GATAATGTGAACCATGCAGTGTG-3'	13
	Reverse	5' -CCAGTGCTTGCTTCCCTTCT-3'	14

[0221] 4) 통계처리

[0222] 본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 $P < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

[0224] 2. 실험 결과

[0225] 1) 세포 독성평가(농도설정)

[0226] Sample의 적정농도를 결정하기 위해 용해도 실험을 거친 후 RAW264.7 세포를 이용하여 세포의 생존율을 측정한 결과는 도 12, 도 13에 나타내었다.

[0227] 같은 20% 에탄올추출물과 강황 20% 에탄올 추출물을 3:7, 5:5, 7:3 비율로 섞은 복합물 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 생존율을 측정한 결과, 3:7 비율 복합물의 경우 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 83.2% 생존율을 유지하고 있으나, 50 $\mu\text{g/mL}$ 이상 처리 시 약 70%로 감소하였고, 5:5 비율 복합물의 경우 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 약 80% 생존율을 유지하고 있으나 75 $\mu\text{g/mL}$ 이상 처리 시 약 73-77% 생존율을 유지하는 것으로 나타났다. 또한 7:3 비율 복합물은 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 80.7% 생존율을 유지하고, 50 $\mu\text{g/mL}$ 이상 처리 시 약 68.0-76.6% 생존율을 유지하는 것으로 나타났다 (도 12).

[0228] 따라서, 복합물 및 추출물을 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 세포에 처리한 후 유전자 발현 실험을 진행하였다.

[0230] 2) Osteoblast 관련 유전자 발현량 측정

[0231] SaOS-2 세포에 같은, 강황 20%에탄올추출 복합물 각 비율대로 혼합한 후 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 ALP mRNA 발현을 측정한 결과를 도 13에 나타내었다. Ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control군에 비해 1.7배 유의적으로 높아졌음을 확인하였다. NC군에 비해 PE10에서 1.6배 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. CE10, PECE1 10, PECE2 10, PECE3 10은 NC 군에 비해 각각 1.1배, 1.3배, 1.3배, 1.3배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그리고 PE20, CE20, PECE1 20, PECE2 20, PECE3 20에서 ALP 유전자 발현은 군에 비해 각각 1.2배, 1.1배, 1.3배, 1.0배, 1.2배 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.(도 13)

[0232] Osteocalcin(OC)은 calcium과 결합하는 vitamin K 의존성 α -carboxy glutamic acid 단백질이고, 뼈의 대표적인 무기질인 수산화인회석과도 결합하며 뼈와 dentin에 매우 특이한 단백질이다.

[0233] SaOS-2 세포에 같은, 강황 20%에탄올추출 복합물 각 비율대로 혼합하여 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 OC mRNA 발현을 측정한 결과를 도14에 나타내었다. Ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 처리한 control군은 normal control군에 비해 2.3배 증가하였음을 확인하였다. PE10, CE10, PECE1 10, PECE2 10, PECE3 10군은 NC군에 비해 각각 1.2배, 2.4배, 4.2배, 1.9배, 5.3배 증가하였고, 특히, CE10, PECE1 10, PECE3 10은 NC군과 유의적인 차이가 나타났다. 또한 PE25, CE25, PECE1 25, PECE2 25, PECE3 25군은 NC군에 비해 OC 유전자 발현이 각각 2.7배, 1.2배, 1.3배, 0.8배, 1.4배 증가하였고, PE25군에서는 NC군에 비해 유의적인 차이가 나타났다. (도 14)

[0235] 3) Osteoclast 관련 유전자 발현량 측정

[0236] Cathepsin K와 c-Fos는 파골세포의 분화에 가장 핵심적인 요소로 파골전구세포인 RAW264.7세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화 유도에 있어서 같은, 강황 20%에탄올추출 복합물 각 비율대로 혼합하여 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 후 cathepsin K와 c-Fos mRNA 발현을 측정한 결과를 도 15, 도 16에 나타내었다.

[0237] Cathepsin K 유전자 발현을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 1.8배 높게 발현되었음을 확인하였고, PE10, CE10, PECE2 10, PECE3 10 처리시 control군에 비해 Cathepsin K의 발현이 각각 0.9배, 1.7배, 3.0배, 1.0배 차이가 나타났고, PE10군에

서만 감소하였고, 다른 군에서는 증가하거나 차이가 없었다. 또한 PE25, CE25, PECE1 25, PECE2 25, PECE3 25 처리시 control군에 비해 Cathepsin K 발현이 1.4배, 0.5배, 0.7배, 0.7배, 0.6배 차이가 나타났고, PE25군에 서만 증가하였고, 다른 군에서는 감소하였다.

[0238] c-fos 유전자 발현을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 2.0배 높게 발현되었음을 확인하였고, PE10, CE10, PECE2 10, PECE3 10 처리시 control군에 비해 c-fos 의 발현이 각각 0.9배, 1.1배, 2.2배, 0.7배 차이가 나타났고, PECE3 10군에서 만 감소하였고 다른 군에서는 차이가 없거나 증가하였다. PE25, CE25, PECE1 25, PECE2 25, PECE3 25 처리시 control군에 비해 c-fos 발현이 1.7배, 0.2배, 0.5배, 0.4배, 0.5배 차이가 나타났고, PE25군에서만 증가하였고, 다른 군에서는 감소하였다.(도15, 도 16)

[0239] MMP-9은 Type IV의 collagenase로 파골세포에서의 과발현은 cetracellular matrix을 분해하는 것으로 파골전구 세포인 RAW264.7세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화 유도에 있어서 같은, 강황 20%에탄올추출 복합물 각 비율대로 혼합하여 10, 25 μ g/mL을 처리한 후 MMP9 mRNA 발현을 측정한 결과를 Fig.15에 나타내었다. MMP- 9유전자 발현을 측정한 결과, RAW264.7 세포에 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 control군은 normal control군에 비해 3.4 배 높게 발현되었음을 확인하였고, PE10, CE10, PECE2 10, PECE3 10 처리시 control군에 비해 c-fos 의 발현이 각각 1.0배, 0.2배, 0.4배, 0.2배 차이가 나타났고, PE10군에서만 증가하였고 다른 군에서는 감소하였다. PE25, CE25, PECE1 25, PECE2 25, PECE3 25 처리시 control군에 비해 c-fos 발현이 0.6배, 0.1배, 0.2배, 0.2배, 0.2배 유의적으로 감소하였다.(도 17)

[0241] 같은 20% 에탄올추출물과 강황 20% 에탄올추출물의 혼합 비율에 따른 조골세포 및 파골세포에서의 생리활성 비교를 살펴본 결과, 같은 20% 에탄올추출물 : 강황 20% 에탄올추출물 =7:3 비율에서 ALP, OC 유전자의 발현이 증가함을 확인하였고, 특히 파골세포분화 관련 유전자인 catehpsin K, c-fos, MMP-9의 유전자 발현이 눈에 띄게 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 같은 20% 에탄올추출물 : 강황 20% 에탄올 추출물=7:3을 이용하여 2차년도 동물실험을 통해 골다공증 생리활성 평가를 진행하였다.

[0243] 실험예 4. 동물 실험을 통한 강황, 같은 추출물의 여성갱년기 개선 생리활성 평가

[0244] 1) 식이농도 설정 평가(독성평가)

[0245] 가. 실험 방법

[0246] (가) 실험동물 관리 및 실험 진행 방법

[0248] 본 실험에서는 5주령 수컷 ICR 마우스(20-25g, n=5), 암컷 ICR 마우스(15-20g, n=5)를 ㈜새론바이오에서 구입하였다. 이용된 ICR 마우스는 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 많은 기초자료가 있어 선택하게 되었다.

[0249] 실험기간동안 AIN-93G 식이(TD.94045, ENVIGO)와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 명암은 12시간(light/dark cycle), 온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 $50 \pm 5\%$ 인 조건에서 1주 동안 적응기를 거쳐 실험에 이용하였다. 동물실의 환경에서 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않아 단회투여 독성검사와 반복투여 독성검사를 실시하였다.

[0251] (나) 단회 및 반복 투여 독성 시험

[0252] 강황등 복합추출물 (PECE, 같은 20% 에탄올추출물 : 강황 20% 에탄올추출물=7:3) 1 g/kg b.w.용량으로 하여 약 18시간 절식시킨 마우스에 경구 투여용 sonde를 장착한 주사기를 이용하여 위 내에 1회 강제투여하였다. 모든 동물에 대하여 매일 1회 증상 관찰을 실시하였으며 체중은 도입 시, 투여 후 7일째에 측정하여 체중 변화를 관찰하였다. 투여 후 7일째 모든 생존 동물의 외관 검사를 실시, 이상이 없는 것으로 보여 PECE(같은 20% 에탄올추출물 : 강황 20% 에탄올추출물=7:3) 1 g/kg b.w.을 마우스에 경구 투여용 sonde를 장착한 주사기를 이용하여 위 내에 14일 동안 동일한 시간에 반복적으로 강제투여를 하였다. 모든 동물에 대하여 매일 1회 증상관찰을 실

시하였으며 체중은 투여 후 14일째에 측정하여 체중 변화를 관찰하였다.

[0253] 투여 후 14일 째 모든 생존 동물의 외관 검사를 실시한 후, 안와동맥을 통해 채혈하여 부검한 후 육안으로 장기를 검사하였다. 혈액은 원심분리하여 혈청을 분리한 후, 분석 전까지 -70℃에 보관하였다.

[0254] 분리한 혈청으로 aspartate aminotransferase(AST, K752), alanine aminotransferase(K753, ALT), glucose(K616), creatine(K777), urea(K376)를 enzyme assay kit(Biovision Inc. Mountain view, CA, USA)로 분석하였다.

[0256] 나. 실험 결과

[0257] 강황등 복합추출물(PECE, 갈근 20% 에탄올추출물 : 강황 20% 에탄올추출물=7:3)의 안전성 평가를 위해 1 g/kg b.w.의 농도로 14일 동안 반복적으로 경구투여하여 사망률 및 일반 증상 관찰하였고 결과는 표 7에 나타내었다. 실험기간 중 PECE 투여에 의한 사망 동물과 이상소견은 관찰되지 않았으며 암수 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다.(표 7)

표 7

[0258] Mortality and Clinical signs (n=5/group)

Sample	Sex	Mortality	clinical signs
PECE	Male	0%(0/5)	Normal
1g/kg b.w.	Female	0%(0/5)	Normal

[0260] 장기 실험의 혈액분석 결과는 표 8에 나타내었으며 생존 동물의 부검 소견 결과는 도 20에 나타내었으며 PECE를 투여한 암수 모두 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서 반복투여 시 독성 반응은 나타나지 않았다. (도 20)

표 8

[0261] Repeated toxicity of *Pueraria lobata* Ohwi extracts and *Curcuma longa*. L extracts on FER, AST, ALT, glucose, creatine, urea in ICR mice (n=5/group)

PCEC 1 g/kg b.w.	Female	Male
AST (mU/mL)	0.008±0.001	0.008±0.001
ALT (mU/mL)	0.001±0.000	0.001±0.000
Glucose (μM/uL)	0.316±0.039	0.296±0.110
Creatine (μM/uL)	2.221±0.213	2.247±0.299
Urea (μM/uL)	1.386±0.039	1.146±0.015

[0263] 2) *In vivo*를 통한 여성갱년기 개선 억제 생리 활성평가(식약처 가이드라인 biomarker - 골 건강 란 참조)

[0264] 2-1. 실험 방법

[0265] (가) 실험동물 관리 및 실험 진행 방법

[0266] 실험동물은 암컷 8주령의 Sprague Dawley(170-180 g, 오리엔트바이오)을 받아 동일한 수술 stress를 유도한 Sham군을 제외한 모든 군은 난소절제술을 시행하고, 일주일 회복 기간을 주고 실험 수행하였다.

[0267] 마취제(Isoflurane, 688.19, piramal)를 이용하여 마취한 후에 난소 수술 부위를 제모하고 소독하여 1 cm 가량 절개하고 다른 장기에 손상이 가해지지 않도록 주의하여 자궁을 따라 난소를 확인하여 봉합용 실로 난소를 결찰한 뒤 양측의 난소를 모두 절제한 후 봉합하였다. 수술은 CRO기관인 쥘노티스에서 진행하였다.

[0268] 실험동물은 1주일간 안정화를 거친 후 암컷 9주령의 Sham(200-210 g, 수술 Stress유도), Ovariectomy(200-230

g, 난소절제) rat을 (주세론바이오에서 공급받아 동물 사육실에서 일정한 조건(온도: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도: $50 \pm 5\%$, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 1주일 동안 주위 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

[0269] 적응 기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 평균 체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 각 군당 8마리의 rat을 이용하여 군을 분리하였다. 난소비절제대조군(Sham Control; Sham), 난소절제대조군(Ovalectomy control; OVX), 양성대조군1(Positive control; OVX+PC1, Estradiol 1 mg/kg b.w. (다립바이오 텍), 양성대조군2(Positive control; OVX+PC2, 식료 추출 건강기능식품(Source naturals사), 200 mg/kg b.w.) Dextrin(OVX+DEX), PECE 50 mg/kg b.w.(갈근 20% 에탄올추출물 : 강황 20% 에탄올추출물=7:3; OVX+Low), PECE 200 mg/kg b.w.(갈근 20% 에탄올추출물 : 강황 20% 에탄올추출물=7:3; OVX+High)으로 분리하여 PC1은 경구로 투여하고 나머지 군들은 식이로 투여하였다. 모든 식이는 AIN93M를 기본으로 제작하였으며 식이와 음수는 8주간 자유로 공급하고 실험기간 동안 식이 섭취량과 체중은 매주 일정한 시간에 측정하였으며, 동물실험은 경희대학교 동물실험윤리 위원회의 승인을 받아 관리지침에 따라 수행하였다(KHUASP(GC)-18-035).

[0270] 체중 및 식이섭취량 측정은 실험기간 동안 실험동물의 체중 증가량은 주 2회씩 일정 시간 전에 실험기간 동안 측정하였고 실험개시일의 체중을 최종 체중을 감하여 체중 변화량을 산출하였다. 식이섭취량은 주 2회씩 측정하였고 측정한 식이는 새로운 식이로 교체하여 실험을 진행하였다. 사육이 끝난 실험동물은 12시간 절식 후 Isoflurane(688.19, piramal)으로 흡입 마취한 상태에서 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액 채취하였으며 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 혈액분석 전까지 -80°C 에서 보관하였고, 채혈을 마친 동물에서 간조직, 신장조직, 비장조직, 자궁조직을 적출하여 무게를 측정하였다.

[0272] (나) 혈중 지질 측정(TC, TG, LDL, HDL)

[0273] 실험동물을 희생시켜 혈액을 채취한 후 원심분리한 Serum을 이용하여 Enzyme assay kit (Biovision Inc, Mountainview, CA, USA) 를 사용하여 TC(K603), TG(K622), HDL(K613), LDL(K613)의 농도 측정하였다

[0275] (다) 혈중 Estrogen, Osteocalcin, ALP, M-CSF, RANKL, OPG 농도 측정

[0276] 실험동물을 희생시켜 혈액을 채취한 후 원심분리한 Serum을 이용하여 Enzyme assay kit (Mybiosource, San Diego, CA, USA) 를 사용하여 Estrogen(MBS703614), Osteocalcin(MBS728975, OS), Alkaline phosphatase(MBS2509314, ALP), Macrophage colony-stimulating factor(MBS2512155, M-CSF), Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B ligand(MBS026225, RANKL), Osteoprotegrin(MBS721528C, OPG)의 농도 측정하였다.

[0278] (라) Micro-CT 측정

[0279] Femur Distal epiphysis 부근의 Growth plate로부터 Proximal epiphysis 방향으로 1.5 mm 떨어진 지점의 2 mm 를 ROI(관심영역) 범위로 설정하여 분석하였다. Scano Medical AG (Viva CT 80, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며 Voxel size는 18 μm , Energy는 70 kvp, Intensity는 114 μA 로 FOV/Diameter는 31.9 mm, Intergration time은 200 ms 조건으로 측정하였다. 분석은 BMD, Trabecular number, Bone volume/Total volume, Trabecular thickness, Trabecular separation을 하였다.

[0281] (마) mRNA expression

[0282] 동물의 골 조직에서 골다공증 관련 유전자 발현을 알아보기 위해 정강이뼈를 Trizol(79306, Qiagen)에 담가 분쇄한 후 원심분리한 상층액을 RNeasy extraction kit (Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 Protocol에 따라 RNA 추출을 하였다.

[0283] iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였고 유전자들의 발현 측정을 위해 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였다.

[0284] 기기는 CFX ConnectTM real-time PCR detection system(Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA,

USA)을 사용하였고, Real time PCR 반응은 총 20 μ L 내에 cDNA 2 μ L와 2X SYBR mix 10 μ L, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μ L를 1 μ L씩 첨가하고 나머지는 증류수로 채웠으며 PCR 반응은 Hot start를 위해 95℃에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95℃에서 15초, annealing을 55℃에서 30초, extension을 72℃에서 30초로 반응시키며 cycle은 40 cycle을 반복하였다.

[0285] 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 Melting curve 분석하였고, 결과는 Bio-rad에서 제공하는 CFX Manager™ software(Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)로 분석하였다. 측정된 primer는 표 9에 나타내었다.

표 9

[0286] Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences		SEQ. ID
GAPDH	Forward	5' -TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC -3'	15
	Reverse	5' -CAGCAACTGAGGGCCTCTCT -3'	16
RANKL	Forward	5'-CATCCCATCTGGTTCCTAA-3'	17
	Reverse	5'-GCCCAACCCGATCATG-3'	18
OPG	Forward	5'-CTGGCACACGAGTGATGAATG-3'	19
	Reverse	5'-TTTCACGGTCTGCAGTTCCTT-3'	20
Cathepsin K	Forward	5'-GAAGACCCACGGGAAGCA-3'	21
	Reverse	5'-CCAAATTAAACGCCGAGAGATT-3'	22

[0288] (바) 통계처리

[0289] 본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean $\pm$ SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 P<0.05수준에서 검정하였다.

[0291] 나. 실험 결과

[0292] (가) 실험동물의 체중변화와 식이효율에 미치는 영향

[0293] 강황등 복합추출물(PECE)의 섭취가 실험동물의 체중 변화와 식이효율에 미치는 영향은 표 10에 나타내었다.

[0294] 체중 증가량을 확인한 결과, Sham군에 비해 OVX군에서 약 84g 유의적으로 증가하였음을 확인하였고, 이는 Estrogen의 감소로 인해 지방 대사의 조절이 어려워지게 됨에 따라 지방의 축적으로 체중이 증가한 것으로 사료된다. Estradiol을 섭취한 PC1군은 OVX 군에 비해 유의적으로 감소하였고, 이는 Sham군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다. 그러나 식류추출 건강기능식품을 섭취한 PC2, PECE 섭취군은 OVX군과 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 식이효율을 확인한 결과, Sham군과 OVX군에서 유의적인 차이가 나타남을 확인하였고, PC1군은 OVX군과 유의적인 차이가 나타났으나 Sham군과는 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다. 또한, PC2, PECE 섭취군은 Sham군과 유의적인 차이가 나타났음을 확인하였다. 이러한 결과는 식이섭취량은 비슷하나, Estrogen의 감소로 인해 지방축적을 위한 체중증가에 따른 결과로 보여진다.(표 10)

표 10

[0295] Weight gain, and FER of experimental animals for 8 weeks. (n=8)

Group ¹⁾	Weight gain ²⁾ (g)	FER (Food efficiency rate) ³⁾
Sham	71.43 $\pm$ 11.14 ^b	11.69 $\pm$ 1.60 ^b
OVX	156.11 $\pm$ 22.11 ^a	18.61 $\pm$ 1.30 ^a
OVX+PC1	57.00 $\pm$ 15.67 ^b	9.82 $\pm$ 2.63 ^b

OVX+PC2	133.57±15.9 ^a	17.46±1.73 ^a
OVX+Dex	152.78±14.34 ^a	18.04±1.10 ^a
OVX+Low	157.72±8.31 ^a	18.44±1.13 ^a
OVX+High	156.65±48.31 ^a	20.15±5.62 ^a

Values are presented as means ± SD. Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

¹⁾ Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Punica Granatum* Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w..

²⁾ Weight gain (g/12weeks) = final body weight (g) -initial body weight (g)

³⁾ FER (Food efficiency rate) = weight (g) / food intake (g) * 100

[0297] (나) 실험동물의 자궁 무게 변화 측정 결과

[0298] 자궁의 무게 변화는 여성갱년기 개별인정형 인정 과정에서 시료의 독성 여부를 판단하는 중요한 지표로 설정되어 있다. PECE의 섭취에 따른 장기 무게에 미치는 영향을 실험한 결과는 표 11에 나타내었으며 모습은 도 21와 같다.

[0299] Sham군에 비해 OVX군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군은 OVX군에 비해 자궁 무게가 유의적으로 증가함을 확인하였다. PECE 섭취군은 OVX군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였고, 이는 시료가 자궁에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미하는 바이다.(도 21)

표 11

Weight of organs extracted from experimental animals

Group	Liver (g/100g b.w.)	Kidney (g/100g b.w.)	Spleen (g/100g b.w.)	uterus (g/100g b.w.)
Sham	2.44±0.32 ^a	0.60±0.04 ^a	0.22±0.02 ^{ns}	0.34±0.15 ^a
OVX	2.05±0.24 ^b	0.46±0.04 ^{cd}	0.22±.03	0.04±0.00 ^c
OVX+PC1	2.38±0.22 ^a	0.54±0.02 ^b	0.22±0.02	0.14±0.04 ^b
OVX+PC2	2.07±0.16 ^b	0.48±0.05 ^c	0.24±0.03	0.04±0.01 ^c
OVX+Dex	2.02±0.13 ^b	0.44±0.04 ^{cd}	0.23±0.04	0.04±0.01 ^c
OVX+Low	1.08±0.10 ^b	0.42±0.04 ^d	0.20±0.02	0.03±0.00 ^c
OVX+High	2.02±0.99 ^b	0.45±0.01 ^{cd}	0.22±0.04	0.03±0.01 ^c

Values are presented as means ± SD. Values not sharing the same letter are significantly different from one another (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

¹⁾ Sham : AIN93M + sham-operated group, OVX : AIN93M + ovariectomized control group, OVX+PC1 : AIN93M + ovariectomized group supplemented estradiol 1 mg/kg b.w., OVX+PC2 : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Punica Granatum* Fruit Extract 200 mg/kg b.w., OVX+Dex : AIN93M + ovariectomized group supplemented dextrin, OVX+Low : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 50 mg/kg b.w., OVX+High : AIN93M + ovariectomized group supplemented *Pueraria lobata* Ohwi extract and *Curcuma longa*. L. extract 7:3 200 mg/kg b.w..

[0302] (㉠) 혈액 Lipid profiles에 미치는 영향

[0303] 난소절제 및 PECE의 투여에 따른 혈중 지질 변화는 도 22에 나타내었다. 혈중 Total cholestrol(TC) 농도를 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군의 TC가 Sham군에 비해 125.69% 유의적으로 증가하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Dex군, OVX+Low군, OVX+High군의 TC가 OVX군에 비해 49.24%, 29.63%, 5.38%, 18.16%, 34.27% 감소함을 확인하였고, 이러한 감소는 OVX+Dex군을 제외한 나머지 군에서 OVX군과 유의적인 차이가 있었음을 확인하였다.

[0304] 혈중 Triglyceride(TG) 농도를 측정한 결과, Sham 군에 비해 OVX군에서 356.46% 유의적으로 증가한 것을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Dex군, OVX+Low군, OVX+High군의 TG 농도는 OVX군에 비해 각각 80.76% 79.75%, 7.86%, 73.06% 73.06% 감소하였다.

[0305] TG 농도 역시 TC 농도와 동일하게 OVX+Dex 군을 제외한 나머지 군에서 OVX군과 유의적인 차이가 있었음을 확인하였다. 혈중 HDL 콜레스테롤 농도(HDL-Chol)을 측정한 결과, OVX+PC1군에서 가장 높게 나타났고, OVX+PC2군에서 가장 낮은 농도를 보였으며, 나머지 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 혈중 LDL 콜레스테롤 농도(LDL-cho1)을 측정한 결과, OVX군에 비해 OVX+PC2군, OVX+Dex군, OVX+High군에서 각각 22.00%, 19.22%, 19.01% 유의적으로 감소함을 확인하였다. (도 22)

[0307] (㉡) 혈청 Estrogen 농도에 미치는 영향

[0308] 난소절제 및 PECE의 투여에 따른 혈중 Estrogen 변화는 도 23에 나타내었다. 난소절제군인 OVX군의 혈중 Estrogen농도는 Sham군에 비해 18.82% 유의적으로 감소하였음을 확인하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군과 식류추출물을 섭취한 OVX+PC2군의 Estrogen농도는 OVX군에 비해 127.16%, 114.11% 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. PECE 섭취군인 OVX+Low군과 OVX+High군은 OVX군에 비해 각각 102.71%, 103.60% 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. (도 23)

[0310] (㉢) 혈청 ALP, OC, OPG, RANKL, M-CSF에 미치는 영향

[0311] 난소절제 및 PECE의 투여에 따른 혈중 ALP, Osteocalcin, OPG, RANKL, M-CSF 변화는 도 24에 나타내었다.

[0312] 혈중 Alkaline phosphatase(ALP) 농도를 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군의 혈중 ALP는 Sham군에 비해 35.35% 유의적으로 감소하였음을 확인하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군과 식류추출물을 섭취한 OVX+PC2군의 ALP농도는 OVX군에 비해 각각 104.77%, 77.90% 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. PECE 투여군인 OVX+Low군과 OVX+High군의 ALP 농도는 OVX군에 비해 각각 29.68%, 48.36% 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

[0313] 혈중 Osteocalcin(OC) 농도를 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군은 Sham군에 비해 41.74% 유의적으로 감소하였음을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Low군, OVX+High군의 혈중 OC 농도는 OVX군에 비해 각각 70.98%, 29.63%, 38.09%, 48.74% 유의적으로 증가하였고, PECE 섭취 농도별 유의성은 나타나지 않았다.

[0314] 혈중 Osteoprotegrin(OPG) 농도를 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군은 Sham군에 비해 26.33% 유의적으로 감소하였음을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Low군, OVX+High군의 혈중 OPG 농도는 OVX군에 비해 각각 28.05%, 40.53%, 33.80%, 33.74% 유의적으로 증가하였고 그 수준은 Sham군과 유사하였다.

[0315] 혈중 Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B ligand(RANKL) 농도를 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군은 Sham군에 비해 138.67% 유의적으로 증가함을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Low군, OVX+High군의 혈중 RANKL 농도는 OVX군에 비해 각각 59.28%, 51.31%, 45.42%, 62.13% 유의적으로 증가하였고 그 수준은 Sham군과 유사하였다.

[0316] 혈중 Macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) 농도를 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군은 Sham군에 비해 103.52% 유의적으로 증가함을 확인하였고, OVX+PC1군, OVX+PC2군, OVX+Low군, OVX+High군의 혈중 RANKL 농도는 OVX군에 비해 각각 32.05%, 31.58%, 27.91%, 50.09% 유의적으로 증가하였다. (도 24)

[0318] (㉣) 골밀도에 미치는 영향

[0319] 난소절제 및 PCEC 섭취에 따른 Femur의 골 종단면과 횡단면 촬영 사진과 골밀도 변화는 도 25에 나타내었다.

Sham군은 난소절제를 하지 않음으로서 해면골의 밀도가 높아 보이고, 난소절제군인 OVX군은 해면골의 밀도가 낮고 빈 공간이 많은 것이 육안으로 확인되었으며, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군과 석류추출물을 섭취한 OVX+PC2, PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군에서 난소절제로 인해 감소하였던 해면골의 밀도가 증가한 것을 육안으로 확인하였다. 골밀도(BMD)의 분석결과, Sham군에 비해 난소절제군인 OVX군에서 78.58% 유의적으로 감소하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군의 BMD는 OVX군에 비해 145.91% 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. 석류추출물을 섭취한 OVX+PC2군과 PECE 저농도 섭취군인 OVX+Low군의 BMD는 OVX군에 비해 각각 34.87%, 51.33% 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았고, PECE 고농도 섭취군인 OVX+High군의 BMD는 OVX군에 비해 67.46% 유의적으로 증가함을 확인하였다.

[0320] 골부피(Bone volume; BV)와 총 부피(Total volume; TV)의 비율 측정결과, Sham군에 비해 난소절제군인 OVX군에서 79.42% 유의적으로 감소하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군의 BV/TV는 OVX군에 비해 130.62% 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. PECE 고농도 섭취군인 OVX+High군의 BV/TV는 OVX군에 비해 72.21% 유의적으로 증가함을 확인하였다.

[0321] Trabecular thickness(Tb.T) 측정한 결과, Sham군에 비해 난소절제군인 OVX군에서 34.15% 유의적으로 감소하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군의 BMD는 OVX군에 비해 21.45% 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. 석류추출물을 섭취한 OVX+PC2군과 PECE 섭취군인 OVX+Low군, OVX+High군의 Tb.T는 OVX군에 비해 각각 2.53%, 7.99%, 10.32% 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.(도 25)

[0323] (사) 골다공증 관련 유전자 발현에 미치는 영향

[0324] 난소절제 및 PCEC 섭취에 따른 골다공증 관련 유전자 발현 변화는 도 26에 나타내었다. OC 유전자 발현 변화를 측정한 결과, Sham군에 비해 난소절제군인 OVX군에서 48.1% 유의적으로 감소하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군의 OC 유전자 발현량은 OVX군에 비해 557.83% 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. PECE 섭취군인 OVX+Low군과 OVX+High군의 OC 유전자 발현량은 OVX군에 비해 각각 262.31%, 453.77% 유의적으로 증가하였고, 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0325] RANKL 유전자 발현을 측정한 결과, 난소절제군인 OVX에서 Sham군에 비해 92.55% 유의적으로 증가하는 것을 확인하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군은 OVX군에 비해 27.35% 유의적으로 감소하였다. 그러나 석류추출물을 섭취한 OVX+PC2군과 텍스트린을 섭취한 OVX+Dex군은 OVX군에 비해 RANKL 유전자 발현량이 유의적인 차이가 없었다. PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군은 OVX군에 비해 RANKL 유전자 발현량이 각각 21.52% 35.53% 유의적으로 감소하였으나 농도에 따른 변화는 없었다.

[0326] Cathepsin K 유전자 발현을 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군에서 Sham군에 비해 85.87% 유의적으로 증가하였고, estradiol을 섭취한 OVX+PC1군과 석류추출물을 섭취한 OVX+PC2군은 OVX군에 비해 각각 45.49%, 21.92% 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군의 cathepsin K 유전자 발현은 OVX군에 비해 각각 19.15%, 32.85% 유의적으로 감소하였으나 농도 간의 차이는 없었다.

[0327] MMP-9 유전자 발현을 측정한 결과, 난소절제군인 OVX군에서 Sham군에 비해 128.44% 유의적으로 증가하였고, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군은 OVX군에 비해 31.25% 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 석류추출물을 섭취한 OVX+PC2군과 텍스트린을 섭취한 OVX+Dex군의 MMP-9 유전자 발현은 OVX군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다. 또한 PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군의 MMP-9 유전자 발현은 OVX군에 비해 각각 17.03%, 27.83% 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. (도 26)

[0329] 3. 결론

[0330] 골의 미세구조 이상과 골량의 감소를 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환인 골다공증은 여성에서 발병률이 높은데 이는 골 손실이 빨리 시작되고 최대 골 질량이 낮기 때문인것으로 알려져 있다. 특히 폐경기 여성의 골다공증은 에스트로겐의 감소와 칼슘 섭취의 부족이 원인으로 알려져 있다.

[0331] 난소절제동물을 이용한 여성갱년기 모델에서 강황등복합추출물(PECE)를 섭취에 따른 변화를 알아본 결과,

[0333] 1) 난소절제 동물인 OVX군과 PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)에서 차이가 없었고, 가장 중요한 자궁 무게 변화

역시 차이가 없었음을 확인하였다.

- [0335] 2) 혈중 Lipd profiles을 측정한 결과, TC, TG 농도가 난소절제 동물인 OVX군과 텍스트린을 섭취한 OVX+Dex에서 가장 높게 나타났고, PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군에서 OVX군에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.
- [0337] 3) 혈중 Estrogen은 난소절제 동물인 OVX군에서 가장 낮았으며, Estradiol을 섭취한 OVX+PC1군에서 혈중 estrogen 농도가 가장 높게 나타났다. PECE를 섭취한 OVX+Low군과 OVX+High군에서 OVX군과 유의적인 차이가 나타나지 않아 호르몬에 영향을 주지 않았음을 확인하였다.
- [0339] 4) 혈중 ALP 농도는 OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 섭취군은 OVX군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 혈중 OC 농도 역시 OVX군에서 가장 낮게 나타났다. PECE 고농도 섭취군(OVX+High)의 혈중 OC 농도는 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였음을 확인하였다.
- [0341] 5) 혈중 OPG 농도는 OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)은 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였다.
- [0343] 6) 혈중 RANKL, M-CSF 농도는 OVX군에서 가장 높게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)은 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.
- [0345] 7) Femur distal epiphysis 부근의 종단면 및 횡단면을 촬영하고 골밀도(BMD)을 측정한 결과, OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 고농도 섭취군인 OVX+High군에서 OVX군에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였다.
- [0347] 8) 골부피(Bone volume; BV)와 총부피(Total volume; TV)의 비율과 Trabecular thickness(Tb.T)을 측정결과, OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)은 OVX군에 비해 증가하는 경향은 나타났으나 유의적인 차이는 없었다.
- [0349] 9) OC 유전자 발현을 측정한 결과, OVX군에서 가장 낮게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)에서 OVX군에 비해 농도 의존적으로 증가하였음을 확인하였다.
- [0351] 10) RANKL, Cathepsin K 유전자 발현을 측정한 결과, OVX군에서 가장 높게 나타났고, PECE 섭취군(OVX+Low, OVX+High)에서 OVX군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였고, 농도에 따른 차이는 나타나지 않았다.
- [0353] 11) MMP-9 유전자 발현을 측정한 결과, OVX군에서 가장 높게 나타났고, PECE(OVX+Low, OVX+High)에서 OVX군에 비해 농도 의존적으로 감소하였음을 확인하였다.
- [0355] 이상의 결과를 토대로 실험에 사용된 PECE가 난소절제 동물모델에서 자궁 및 호르몬에 영향을 주지 않는 범위에서 여성갱년기(골다공증) 억제 효과가 있음을 확인하였다.

[0357] **1-3. 통계처리**

[0358] 모든 실험 결과는 ANOVA(one way analysis of variance)를 이용하여 통계 처리하였고, 유의성이 인정될 경우 Student-Newman-Keuls Test를 사용하여 $p < 0.05$ 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0360] 본 발명의 추출물들을 포함하는 조성물의 제제 예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0362] **제제예 1. 산제의 제조**

[0363] CW ----- 20 mg

[0364] 유당 ----- 100 mg

[0365] 탈크 ----- 10 mg

[0366] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0368] **제제예 2. 정제의 제조**

[0369] CE ----- 10 mg

[0370] 옥수수전분 ----- 100 mg

[0371] 유당 ----- 100 mg

[0372] 스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg

[0373] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0375] **제제예 3. 주사제의 제조**

[0376] PECE ----- 10 mg

[0377] 만니톨 ----- 180 mg

[0378] 주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg

[0379] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ----- 26 mg

[0380] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0382] **제제예 4. 액제의 제조**

[0383] PECE ----- 20 mg

[0384] 이성화당 ----- 10 g

[0385] 만니톨 ----- 5 g

[0386] 정제수 ----- 적량

[0387] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0389] **제제예 5. 건강 식품의 제조**

[0390] PECE ----- 1000 mg

[0391]	비타민 혼합물 -----	적량
[0392]	비타민 A 아세테이트 -----	70 μg
[0393]	비타민 E -----	1.0 mg
[0394]	비타민 B ₁ -----	0.13 mg
[0395]	비타민 B ₂ -----	0.15 mg
[0396]	비타민 B ₆ -----	0.5 mg
[0397]	비타민 B ₁₂ -----	0.2 μg
[0398]	비타민 C -----	10 mg
[0399]	비오틴 -----	10 μg
[0400]	니코틴산아미드 -----	1.7 mg
[0401]	엽산 -----	50 μg
[0402]	판토텐산 칼슘 -----	0.5 mg
[0403]	무기질 혼합물 -----	적량
[0404]	황산제1철 -----	1.75 mg
[0405]	산화아연 -----	0.82 mg
[0406]	탄산마그네슘 -----	25.3 mg
[0407]	제1인산칼륨 -----	15 mg
[0408]	제2인산칼슘 -----	55 mg
[0409]	구연산칼륨 -----	90 mg
[0410]	탄산칼슘 -----	100 mg
[0411]	염화마그네슘 -----	24.8 mg
[0412]	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.	
[0414]	제제예 6. 건강 음료의 제조	
[0415]	PECE -----	100 mg
[0416]	비타민 C -----	15 g
[0417]	비타민 E(분말) -----	100 g
[0418]	젖산철 -----	19.75 g
[0419]	산화아연 -----	3.5 g
[0420]	니코틴산아미드 -----	3.5 g
[0421]	비타민 A -----	0.2 g
[0422]	비타민 B ₁ -----	0.25 g
[0423]	비타민 B ₂ -----	0.3 g

- [0424] 물 ----- 정량
- [0425] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
- [0426] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0428] **제제예 7. 씨리얼의 제조**

- [0429] PECE ----- 7.51 g
- [0430] 쌀 ----- 40.49 g
- [0431] 현미 ----- 24.29 g
- [0432] 수수 ----- 2.02 g
- [0433] 보리 ----- 2.02 g
- [0434] 찹쌀 ----- 2.02 g
- [0435] 소금 ----- 0.49 g
- [0436] 깨 ----- 0.16 g
- [0437] 설탕 ----- 17.75 g
- [0438] 해바라기유 ----- 1.21 g
- [0439] 물 ----- 정량
- [0440] 통상의 씨리얼 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 압출성형, 1차건조, 숙성, 파칭, 시럽코팅, 2차건조 과정, 포장한 다음 본 발명의 씨리얼 조성물 제조에 사용한다.
- [0441] 상기 조성비는 비교적 기호에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0443] **제제예 8. 초코 크런치의 제조**

- [0444] PECE ----- 5.00 g
- [0445] 쌀 ----- 21.50 g
- [0446] 정백당 ----- 23.02 g
- [0447] 혼합전지분유 ----- 27.78 g
- [0448] 코코아버터 ----- 15.35 g
- [0450] 식물성경화유 ----- 13.02 g
- [0451] 레시틴 ----- 0.15 g
- [0452] 폴리글리세린축합리시놀레인산에스테르 ----- 0.15 g
- [0453] 바닐린 ----- 0.03 g

[0456]	제제예 9. 과자류의 제조
[0457]	PECE ----- 5.00 g
[0458]	전분 ----- 83.00 g
[0459]	쌀가루 ----- 10.00 g
[0460]	천일염 ----- 0.5 g
[0461]	유자시즈닝 ----- 1.5 g
[0463]	[이 발명을 지원한 국가연구개발사업]
[0464]	[과제고유번호] 118036-03
[0465]	[부처명] 농림축산식품부
[0466]	[연구사업명] 고부가가치식품기술개발사업
[0467]	[연구과제명] 강황, 갈근을 이용한 여성갱년기 건강기능식품 산업화
[0468]	[주관기관] 농업회사법인(주)산들촌
[0469]	[연구기간] 2018.04.30.~2020.12.31.
[0470]	[기여율] 1/1

도면

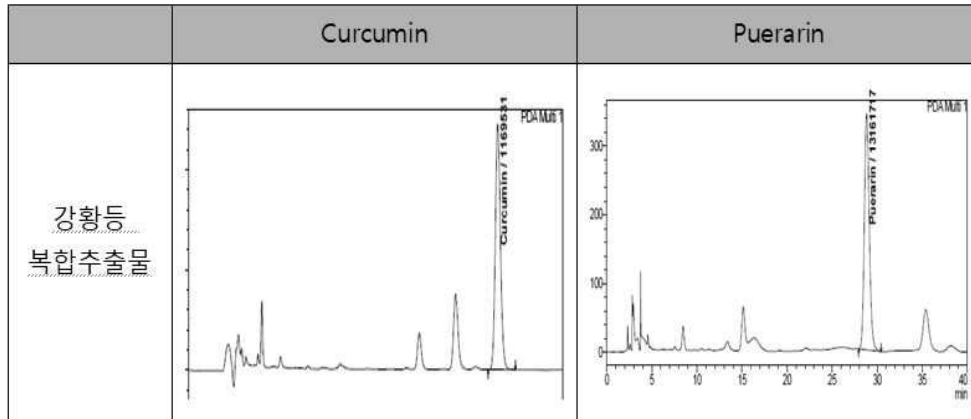
도면1

강황 및 갈근 혼합추출물의 제조과정

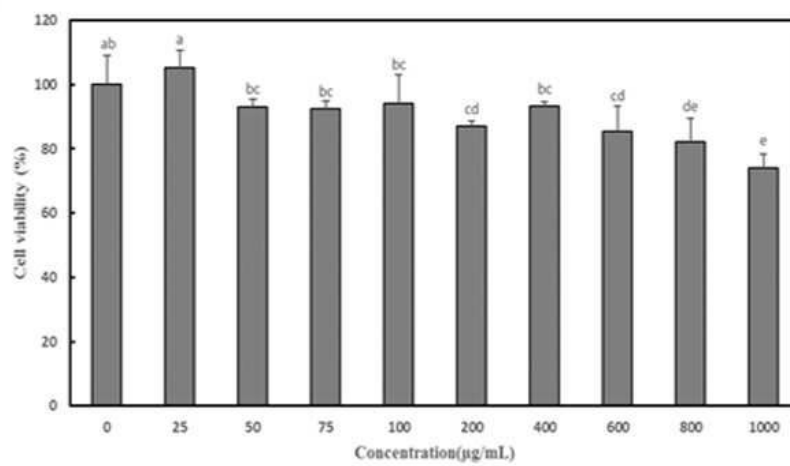


도면2

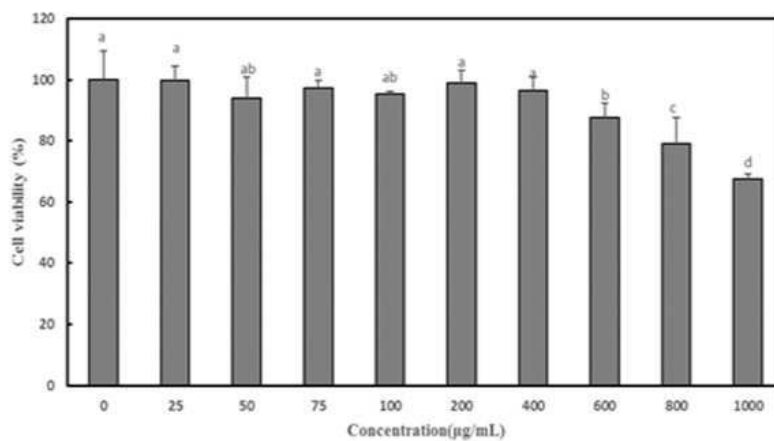
지표성분들의 HPLC 분석결과



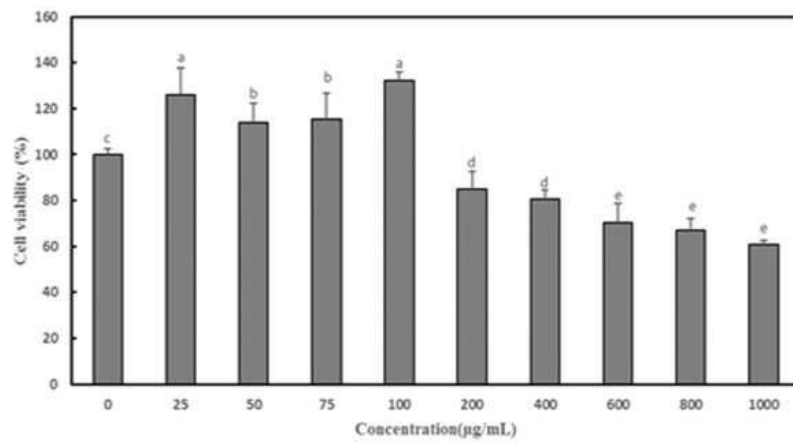
도면3



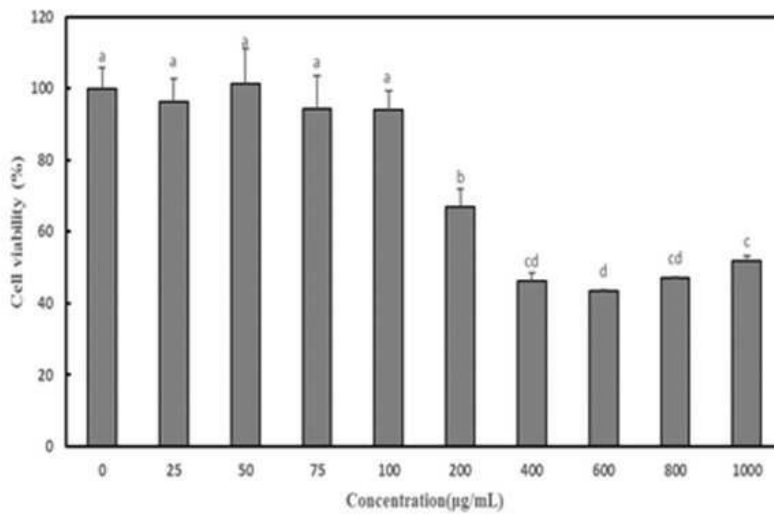
도면4



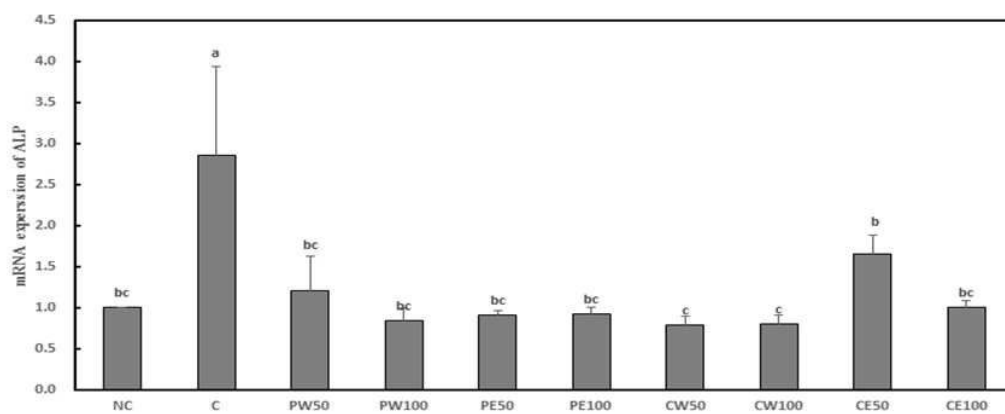
도면5



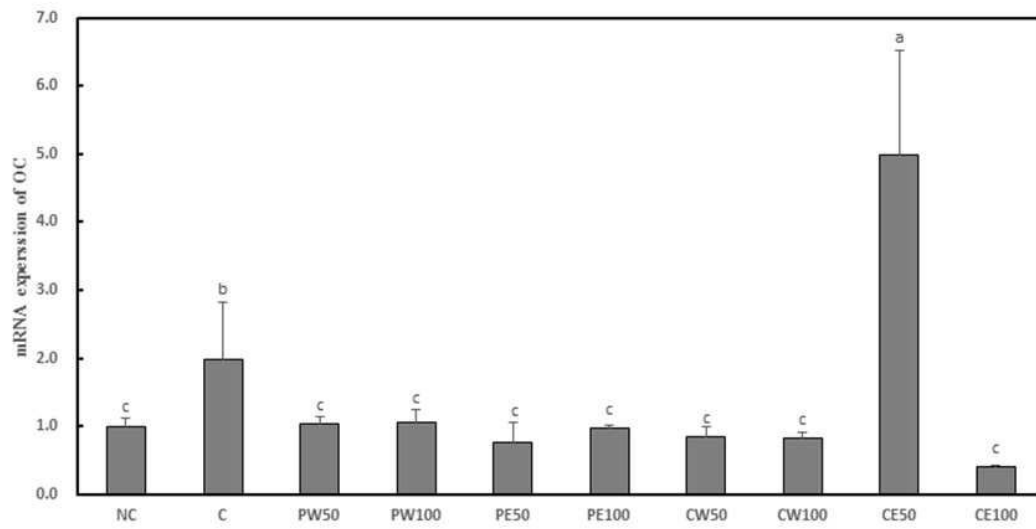
도면6



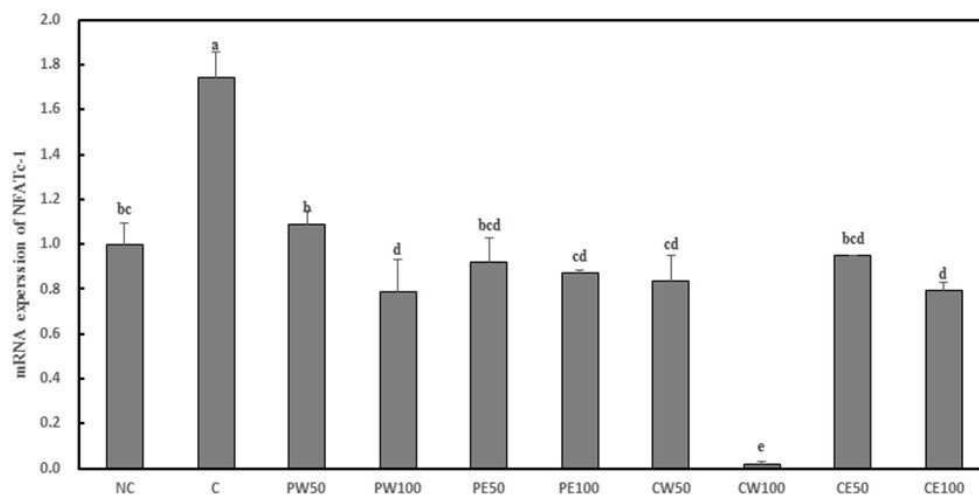
도면7



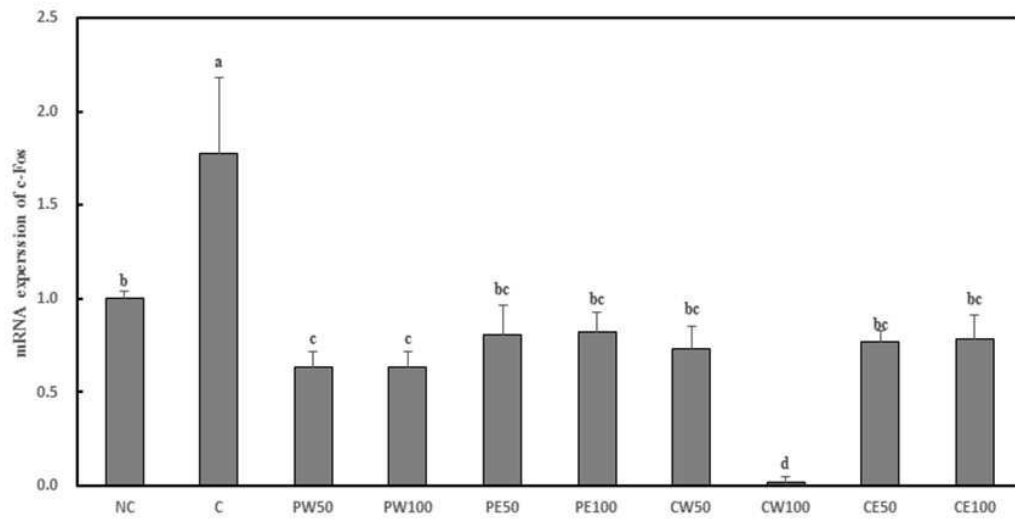
도면8



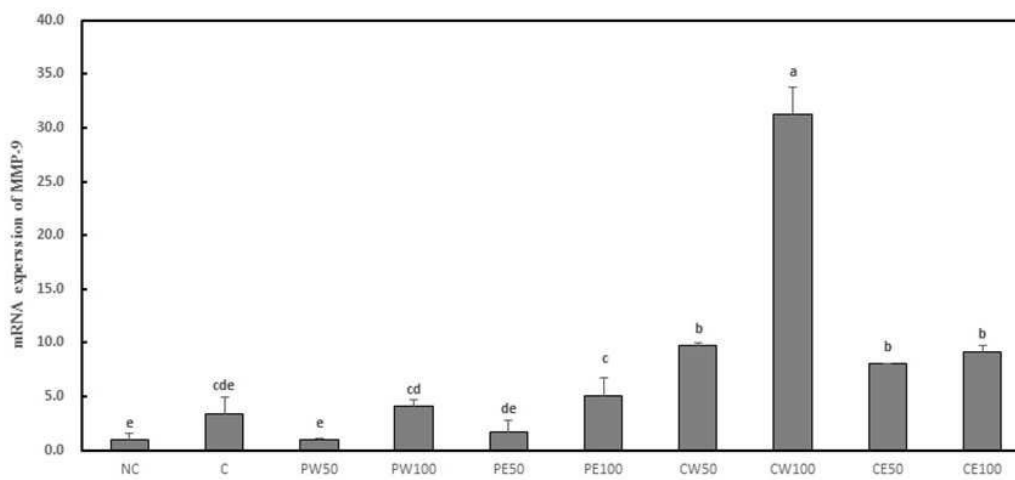
도면9



도면10

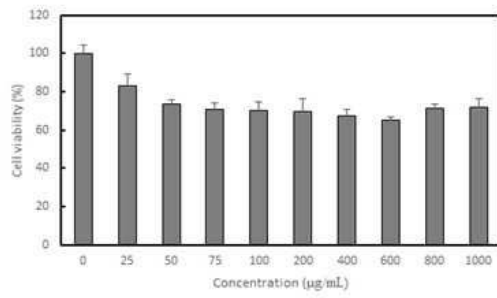


도면11

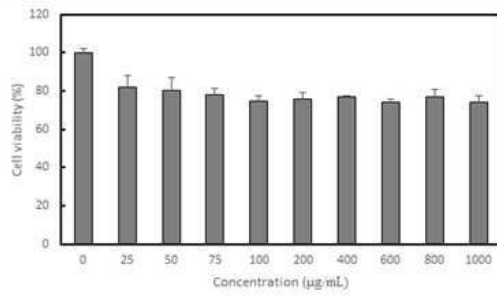


도면12

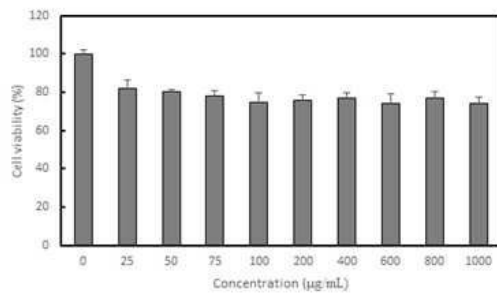
(A)



(B)

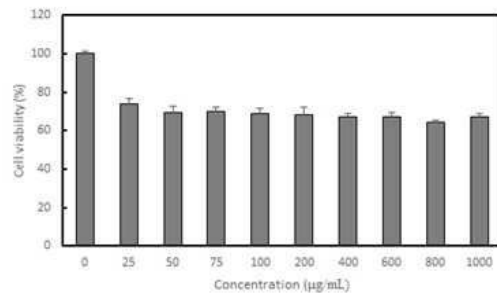


(C)

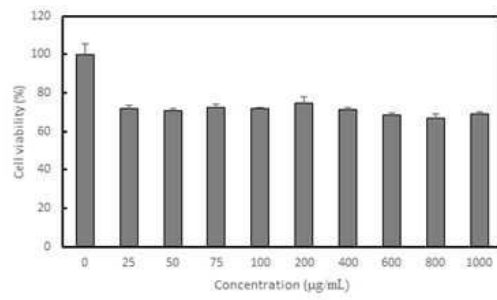


도면13

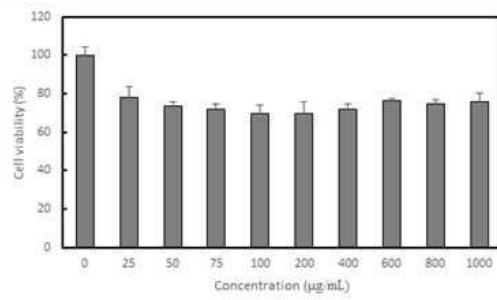
(A)



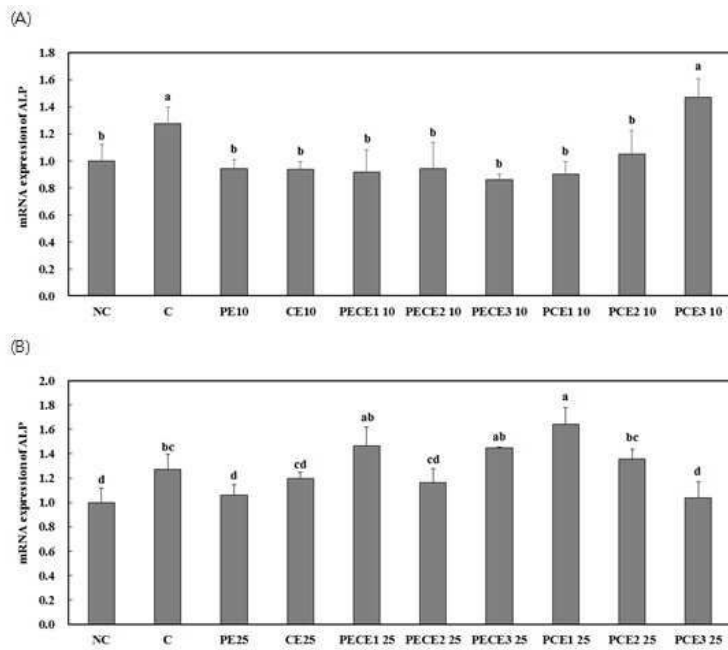
(B)



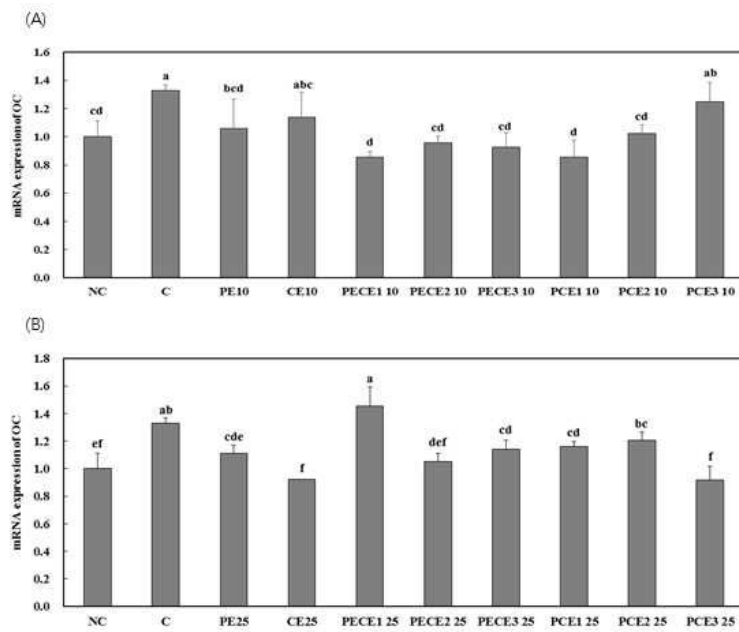
(C)



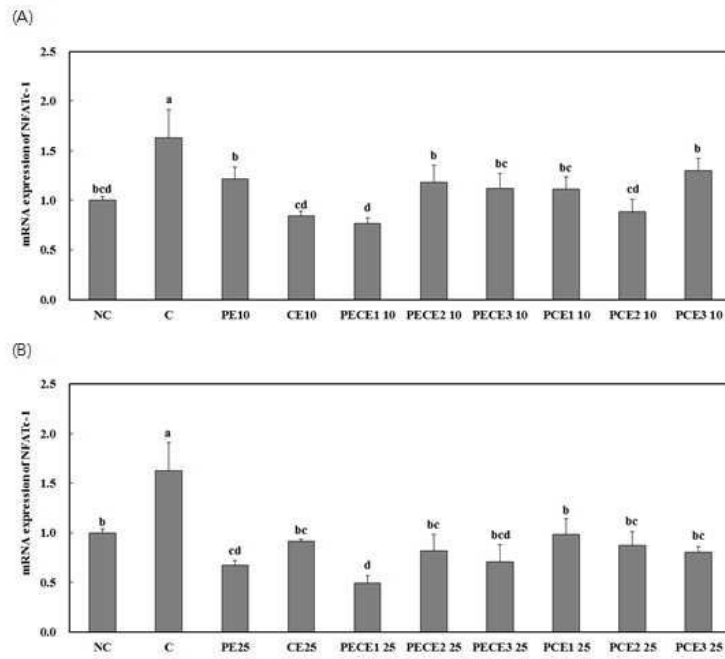
도면14



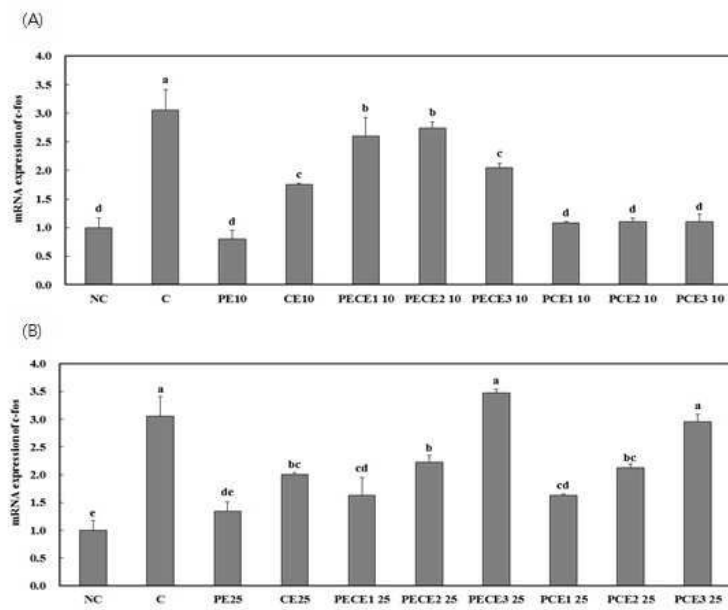
도면15



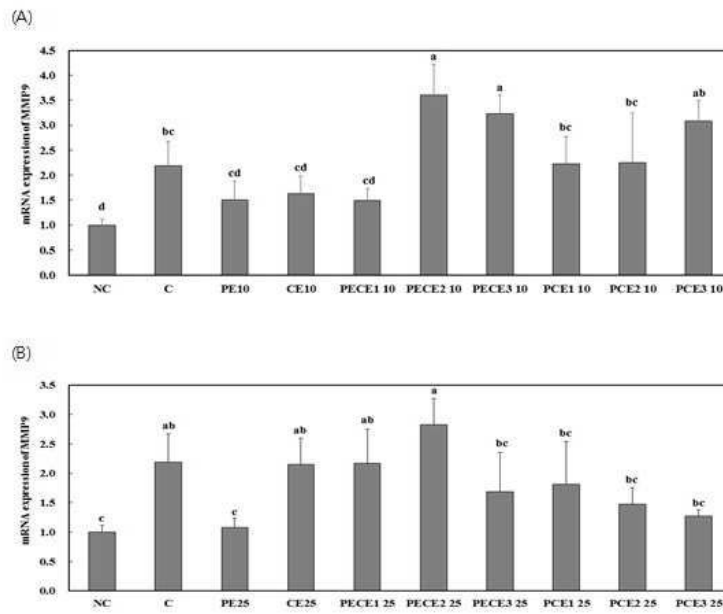
도면16



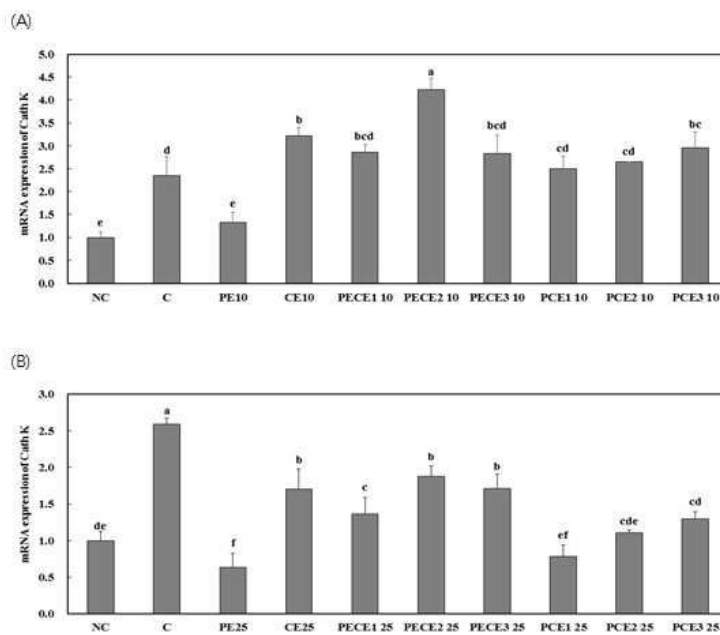
도면17



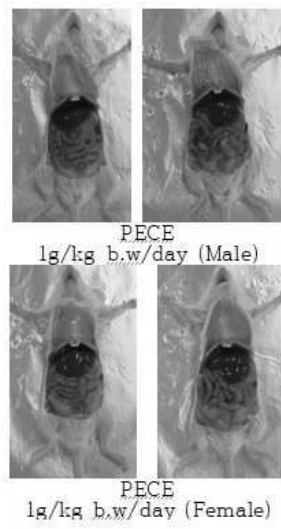
도면18



도면19



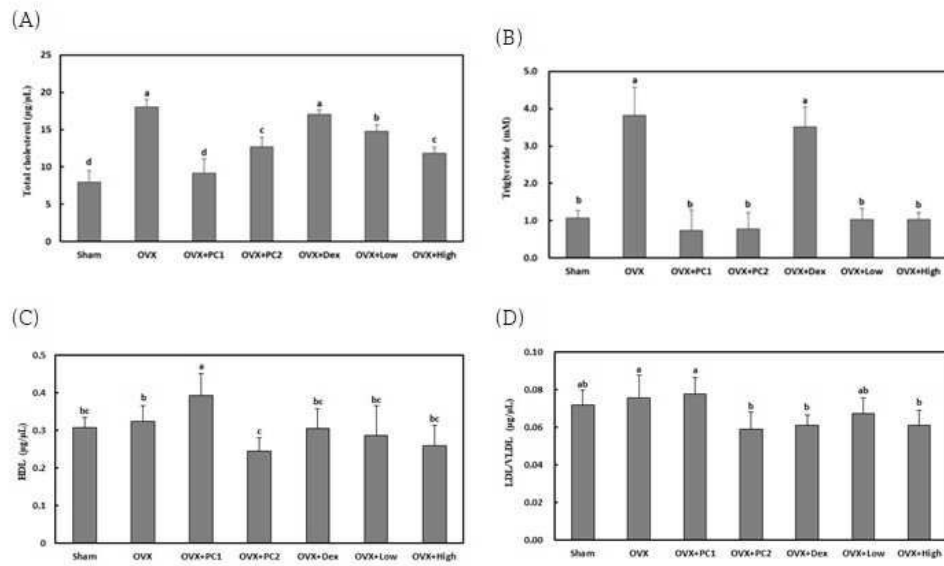
도면20



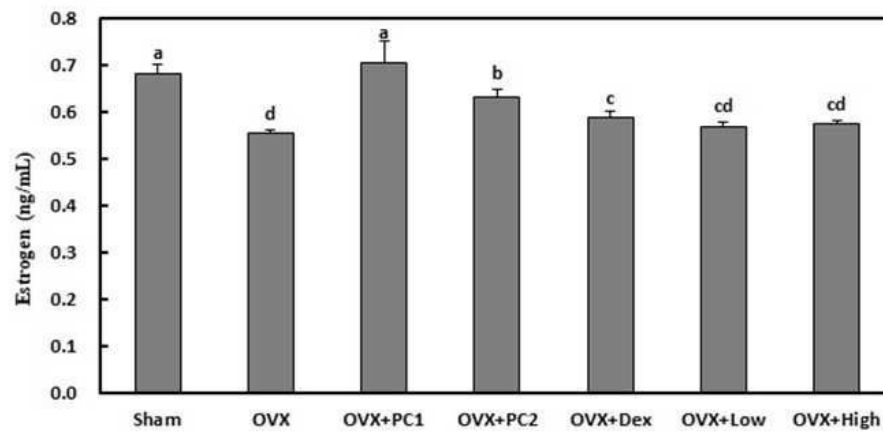
도면21

Liver							
Kidney							
Spleen							
Uterus							
	Sham	OVX	OVX + PC1	OVX + PC2	OVX+DEX	OVX+Low	OVX+High

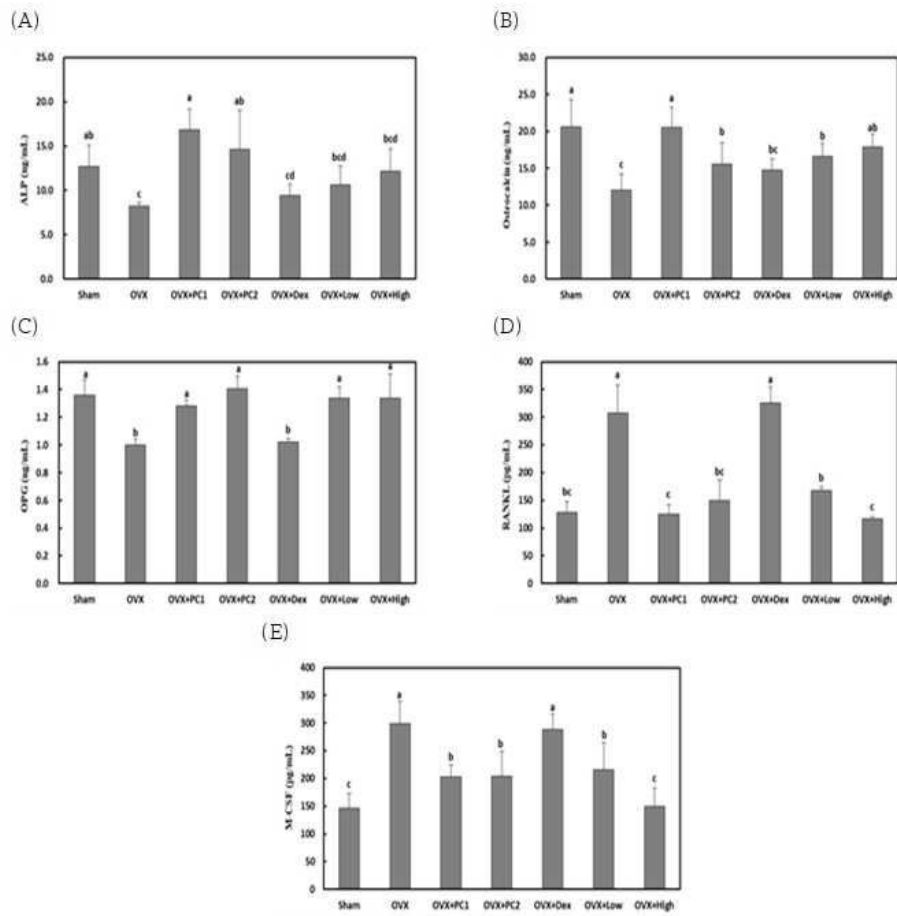
도면22



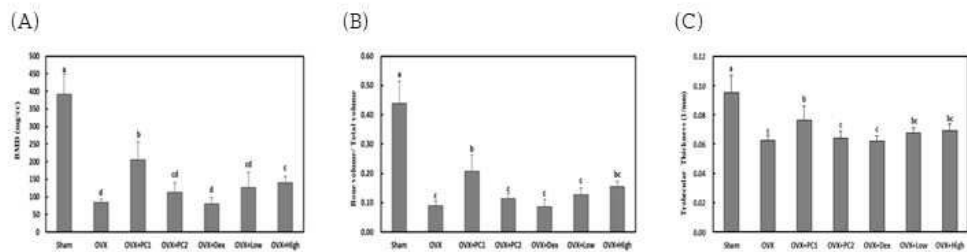
도면23



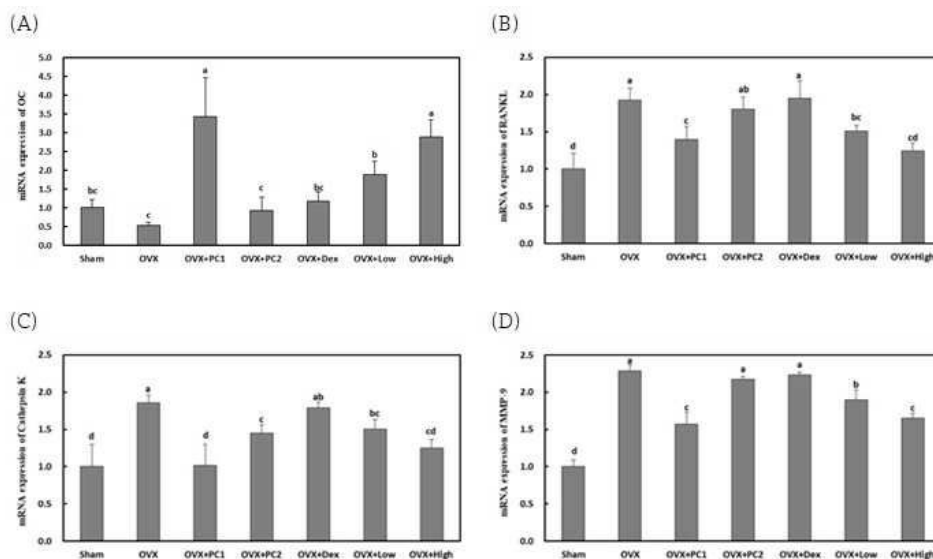
도면24



도면25



도면26



서열목록

<110> SDCFOOD CO., LTD.

University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> A Composition Comprising the extract of *Curcuma longa* Linne for preventing or improving the hormonal abnormal syndrome in women

<130> DIF/2019-10-004/EK
 <160> 22
 <170> KoPatent In
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 1
 ATG GAA ATC CCA TCA CCA TCT T 22
 <210> 2
 <211> 18
 <212>
 DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 2
 CGC CCC ACT TGA TTT TGG 18
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 3
 CCG CTT TAA CCA GTG CAA CA 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 4
 CCC GAT TCA TCA CGG AGA TG 20
 <210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 5
 CAG GAG GGC AGC GAG GTA 18

<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Homo Sapiens	
<400>	6	
CAG GAG GGC AGC GAG GTA		18
<210>	7	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	7	
CCT GGA GAT CCC GTT GCT T		19
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	8	
AGG ATC CCA GCA CAG TCG A		19
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	9	
GAG ACC CCC TAA GAT CCC AAA		21
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	10	
AAC CCC CGT CTT GGC ATA C		19
<210>	11	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	

<400>	11	
ACG CCA CGC ATT TTC AAA		18
<210>	12	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	12	
GGC CCA TTC CCT CCA CAT		18
<210>	13	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	13	
GAT AAT GTG AAC CAT GCA GTG TTG		24
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Mus musculus	
<400>	14	
CCA GTG CTT GCT TCC CTT CT		20
<210>	15	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	15	
TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C		19
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	16	
CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT		20
<210>	17	

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	17	
CAT CCC ATC TGG TTC CCA TAA		21
<210>	18	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	17	
GCC CAA CCC CGA TCA TG		17
<210>	19	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	19	
CTG GCA CAC GAG TGA TGA ATG		31
<210>	20	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	20	
TTT CAC GGT CTG CAG TTC CTT		21
<210>	21	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	21	
GAA GAC CCA CGG GAA GCA		18
<210>	22	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	

<400> 22

CCA AAT TAA ACG CCG AGA GAT T

22