

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0122225 (43) 공개일자 2012년11월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/535 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0040273 (22) 출원일자 2011년04월28일 심사청구일자 2011년04월28일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 이광원 경기도 성남시 분당구 양현로 220, 1104동 1901호 (이매동, 이매촌) 양성용 서울특별시 성북구 보문로 61, 에이스오피스텔 606호 (보문동7가) (뒷면에 계속) (74) 대리인 김선애

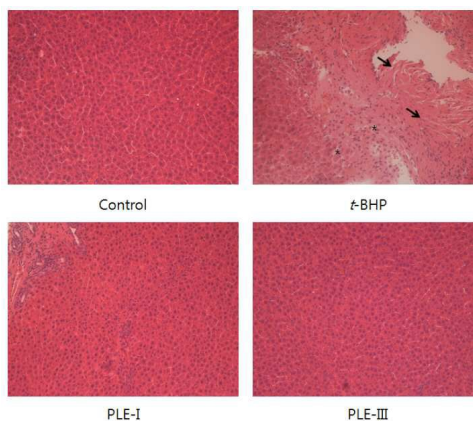
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 기능성 들깨잎 추출물을 함유하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 기능성 들깨잎 추출물을 함유하는 간 보호 및 간 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

홍충의

서울특별시 성북구 안암로 145, 자연계캠퍼스 CJ
식품안전관 203호 (안암동5가, 고려대학교)

남미현

대구광역시 동구 안심로22길 55, 712동 1206호 (율
하동, 율하휴먼시아7단지)

이지영

경상북도 울진군 울진읍 월변3길 11-17

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 108066032HD110

부처명 농림기술관리센터

연구사업명 농림수산특정연구개발사업

연구과제명 [협동]고기능성 들깨잎의 효능 및 안정성 평가

주관기관 (주)바이오버드

연구기간 2009.06.25 ~ 2010.06.24

특허청구의 범위

청구항 1

들깨잎 추출물을 포함하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 들깨잎은 설탕물을 이용하여 재배된 것을 특징으로 하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 설탕물의 농도는 4%~ 8% 농도 범위인 것을 특징으로 하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

들깨잎 추출물을 포함하는 간 보호 및 간 기능개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 들깨잎은 설탕물을 이용하여 재배된 것을 특징으로 하는 간 보호용 기능성 식품 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 설탕물의 농도는 4%~ 8% 농도 범위인 것을 특징으로 하는 간 보호용 기능성 식품 조성물.

청구항 7

설탕물을 이용하여 카페인산 함유량이 증대된 들깨잎의 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 설탕물의 농도는 4%~ 8% 농도 범위인 것을 특징으로 하는 카페인산 함유량이 증대된 들깨잎의 제조방법.

청구항 9

카페인산을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 10

카페인산을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 기능개선용 기능성 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 기능성 들깨잎 추출물을 함유하는 간 보호 및 간 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 들깨는 꿀풀과의 일년생 초본이며, 원산지는 한반도를 포함한 동부아시아 고원지대이다. 들깨는 기름을 짜내기 위하여 재배되는 작물인데, 생육하는 동안에 잎을 수확하여 식용으로 하는 것이 바로 깻잎이다. 농상집요(農桑輯要, 1273년)에 처음으로 기록되었고 참깨보다도 재배역사가 오래며, 고서에는 임(荳), 임자(荳子), 수임(水荳), 수소마(水蘇麻), 유마(油麻), 지마(脂麻) 등으로 불려졌다.

[0003] 들깨잎은 나물 반찬이나 장아찌, 깻잎 김치 등의 밑반찬으로 먹기도 하고, 무침이나 탕 등에 향신료처럼 사용되

기도 한다. 과거에는 주로 종실유를 채취할 목적으로 들깨가 재배되어왔으나 최근 육류의 소비증가, 외식문화의 발달 및 웰빙 열풍에 의한 쌈채소 소비 시장의 급성장으로 들깨용 품종이 개발되어 연중 생산이 가능해졌다. 따라서 들깨잎의 의학적 기능성을 밝히고 이를 식품, 의약 부문에 다양하게 응용할 경우 산업상 이용 가치가 클 것으로 예상된다.

[0004] 들깨는 우리 민족 전통식품으로 들기름, 들깻묵, 들깨잎 등은 우리들의 건강을 지켜왔고, 독특한 향미를 주는 들깨의 잎은 우리 민족이 가장 즐겨 애용하는 대표식품이며 세계에 자랑할 수 있는 훌륭한 기능성식품이라 할 수 있으나 단순히 생식으로만 소비되고 있는 소비형태와 수확시기의 잉여품에 대한 저장성의 문제로 저가 소득 작목으로 인식되고 있다.

[0005] 들깨잎의 기능성을 나타내는 물질로는 페릴라알데하이드, 로즈마리산, 안토시아닌, 카페인산 등이 보고된 바 있다. 이들 성분은 높은 수용성을 갖기 때문에 섭취하였을 경우 높은 이용율을 기대할 수 있다.

[0006] 한편, 국내의 간 질환 및 간암에 의한사망률은 전체 사망 원인의 10%를 차지한다. 통계청에서 발표한 2005년 사망원인 통계결과에 따르면 국내 사망원인의 6위에 간 질환이 올라있다.

[0007] 그러나, 병원 또는 시중에서 처방되는 간장약은 대개 동물 또는 임상 시험에서 급성 간손상에 대한 예방 및 치료 효과를 보이는 것들이며, 이들 대부분은 합성 화학 물질로서 병을 근본적으로 치료한다기보다는 간세포의 손상을 경감시킨다는 의미에서 보조 치료제로 기능할 뿐이다.

[0008] 합성 화학 물질이 아닌 천연 물질에서 간 보호 및 간 기능 향상 치료제를 찾는 기술의 개발이 요구되고 있다.

[0009] 이러한 요구에 따라서, 종래 식물의 추출물을 이용하여 간암 및 간질환 치료에 이용하는 다양한 기술이 개발되었는데, 버섯 추출물, 마늘 추출물, 콩나물 추출물이 그 예이다. 종래 기술은 간보호 효과를 나타내는 식품 추출물을 유효성분으로 한 의약품이나 기능성 식품 제조에 관한 것이며, 이러한 식품 추출물은 혈청 ALT와 AST 수치를 유의적으로 증가시키므로써 궁극적으로 간 보호 작용을 나타낸다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 간 보호 및 간 질환 예방 활성을 갖는 카페인산의 함량을 증가시키는 재배법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 간 보호 및 간 질환 예방 활성을 갖는 식품 조성물 및 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 들깨잎 추출물을 포함하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 들깨잎은 설탕물을 이용하여 재배된 것이 바람직하고, 상기 설탕물의 농도는 4%~ 8% 농도 범위인 것이 더욱 바람직하며, 6% 농도인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 또 본 발명은 들깨잎 추출물을 포함하는 간 보호용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 설탕물을 이용하여 카페인산 함유량이 증대된 들깨잎의 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 카페인산을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 카페인산을 유효성분으로 포함하는 간 보호용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 화합물 또는 추출물을 의약으로서 사용하는 경우, 통상, 본 발명의 화합물 또는 추출물과 적당한 첨가제를 혼화하여 제제화한 것을 사용한다.

[0019] 상기 첨가제로서는 일반적으로 의약에 사용되는 부형제, 결합제, 활택제, 붕괴제, 착색제, 교미 교취제,유화제, 계면 활성제, 용해 보조제, 현탁화제, 등장화제, 완충제, 방부제, 향산화제, 안정화제, 흡수 촉진제 등을 들 수 있고, 소망에 따라 이들을 적절하게 조합하여 사용할 수도 있다.

[0020] 상기 부형제로서는 예컨대 젓당, 백당, 포도당, 콘스타치, 만니톨, 소르비톨, 전분, α화 전분, 텍스트린, 결정

셀룰로오스, 경질 무수 규산, 규산알루미늄, 규산칼슘, 메타규산알루미늄산마그네슘, 인산수소칼슘 등을 들 수 있고,

[0021] 상기 결합제로서는 예컨대 폴리비닐알코올, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 아라비아 고무, 트래거캔스, 젤라틴, 셀락, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 폴리비닐피롤리돈, 매크로골 등을 들 수 있으며,

[0022] 상기 활택제로서는 예컨대 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 푸마르산스테아릴나트륨, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 콜로이드실리카 등을 들 수 있고,

[0023] 상기 붕괴제로서는 예컨대 결정 셀룰로오스, 한천, 젤라틴, 탄산칼슘, 탄산수소나트륨, 시트르산칼슘, 텍스트린, 펙틴, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 크로스카멜로오스나트륨, 카르복시메틸스타치, 카르복시메틸스타치나트륨 등을 들 수 있다.

[0024] 상기 착색제로서는 예컨대 삼이산화철, 황색 삼이산화철, 카르민, 카라멜, β -카로틴, 산화티탄, 탈크, 인산리보플라빈나트륨, 황색 알루미늄레이크 등, 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것을 들 수 있고,

[0025] 상기 교미 교취제로서는 코코아 분말, 박하뇌, 방향산, 박하유, 용뇌, 계피분말 등을 들 수 있으며,

[0026] 상기 유화제 또는 계면 활성제로서는 예컨대 스테아릴트리에탄올아민, 라우릴황산나트륨, 라우릴아미노프로피온산, 레시틴, 모노스테아르산글리세린, 자당 지방산 에스테르, 글리세린 지방산 에스테르 등을 들 수 있고,

[0027] 상기 용해 보조제로서는 예컨대 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 벤조산벤질, 에탄올, 콜레스테롤, 트리에탄올아민, 탄산나트륨, 시트르산나트륨, 폴리솔베이트 80, 니코틴산아미드 등을 들 수 있으며,

[0028] 상기 현탁화제로서는 상기 계면 활성제 이외에 예컨대 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등의 친수성 고분자를 들 수 있고,

[0029] 상기 등장화제로서는 예컨대 포도당, 염화나트륨, 만니톨, 소르비톨 등을 들 수 있으며,

[0030] 상기 완충제로서는 예컨대 인산염, 아세트산염, 탄산염, 시트르산염 등의 완충액을 들 수 있고,

[0031] 상기 방부제로서는 예컨대 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로로부탄올, 벤질알코올, 페네틸알코올, 디히드로아세트산, 소르브산 등을 들 수 있으며,

[0032] 상기 향산화제로서는 예컨대 아황산염, 아스코르빈산, α -토코페롤 등을 들 수 있다.

[0033] 상기 안정화제로서는 일반적으로 의약에 사용되는 것을 들 수 있다.

[0034] 상기 흡수 촉진제로서는 일반적으로 의약에 사용되는 것을 들 수 있다.

[0035] 또한, 상기 제제로서는 예컨대 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 시럽제, 트로치제, 흡입제와 같은 경구제; 예컨대 좌제, 연고제, 안연고제, 테이프제, 점안제, 점비제, 점이제, 파프제, 로션제와 같은 외용제 또는 주사제를 들 수 있다.

[0036] 상기 경구제는 상기 첨가제를 적절하게 조합하여 제제화한다. 또한, 필요에 따라 이들 표면을 코팅하여도 좋다.

[0037] 상기 외용제는 상기 첨가제 중 특히 부형제, 결합제, 교미 교취제, 유화제, 계면 활성제, 용해 보조제, 현탁화제, 등장화제, 방부제, 향산화제, 안정화제 또는 흡수 촉진제를 적절하게 조합하여 제제화한다.

[0038] 상기 주사제는 상기 첨가제 중 특히 유화제, 계면 활성제, 용해 보조제, 현탁화제, 등장화제, 완충제, 방부제, 향산화제, 안정화제 또는 흡수 촉진제를 적절하게 조합하여 제제화한다.

[0039] 본 발명에 따른 화합물 또는 추출물을 의약으로서 사용하는 경우, 그 사용량은 증상이나 연령에 따라 다르지만, 통상, 경구제의 경우에는 0.1 mg 내지 10 g(바람직하게는 1 mg 내지 2 g), 외용제의 경우에는 0.01 mg 내지 10 g(바람직하게는 0.1 mg 내지 2 g), 주사제의 경우에는, 0.01 mg 내지 10 g(바람직하게는 0.1 mg 내지 2 g)를 1 일 1회 투여 또는 2 내지 4회로 나누어 사용한다.

[0040] 본 발명은 간질환의 예방 및 개선효과를 갖는 상기한 본 발명의 카페인산 또는 들깨잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 카페인산 또는 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.

[0041] 또한, 간질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추

출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.

[0042] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제, 액제등의 형태를 포함한다.

[0043] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 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 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0044] 상기 외에 본 발명의 카페인산 또는 추출물은 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.

[0045] 본 발명의 화합물들은 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 카페인산 또는 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0046] 이하 본 발명을 설명한다.

[0047] 본 발명은 들깻잎에 대하여 설탕물을 이용하여 재배하는 단계를 제공한다.

[0048] 또한 본 발명의 추출 단계는

[0049] 건조 들깻잎에 대하여 증류수를 이용한 환류 냉각추출을 수행하는 단계;

[0050] 상기 환류 냉각추출 단계로부터 얻어진 추출물에 대하여 원심분리를 수행하여 상등액을 얻는 단계;

[0051] 상기 상등액을 여과한 여과액을 감압농축 및 동결건조시킴으로써 들깻잎 추출 분말을 얻는 단계를 제공한다.

[0052] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 환류 냉각추출 단계는 건조 들깻잎 100g에 대해서 2.8리터 내지 3.2리터 부피의 증류수로 100℃ 내지 110℃ 온도에서 3시간 내지 4시간 동안 추출하는 과정을 2회 반복함으로써 수행될 수 있다.

[0053] 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 원심분리 단계는 4℃의 온도에서, 7,500rpm의 속도로 25분 내지 30분 동안 수행될 수 있다.

[0054] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0055] 들깻잎에 함유된 카페인산은 섭취하였을 경우 소장 흡수율이 95% 이상으로 체내 이용률이 매우 우수하며, 카페인산은 강한 항산화 활성을 갖기 때문에 항암 효과가 있다고 알려져 있다. 이에 더하여, 본 발명은 설탕물을 이용하여 재배한 들깻잎으로부터 간 보호 효과가 있는 카페인산을 증가시키는 효과가 있다는 사실을 밝혀내었으며, 이에 기초하여 기능성 들깻잎으로부터 효과적이고 간편하게 추출물을 제조하는 방법을 제공하고 자 한다.

발명의 효과

[0056] 본 발명에 따르면, 설탕물을 이용하여 재배한 들깻잎으로부터 간편하고 저렴한 방법으로 추출물을 제조할 수 있으며, 제조된 추출물을 포함하는 식품 조성물 및 약학 조성물을 간 보호 및 간 질환의 예방 및 치료에 광범위하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 본 발명에 따른 방법에 의해서 얻어진 설탕물을 이용한 재배시 들깻잎의 항산화 능력을 보여준다. 여기서 6% 설탕물을 사용하였을 때 항산화 활성이 높음을 알 수 있다.

도 2는 설탕물을 이용한 재배시 들깻잎 추출물의 기능성 물질인 caffeic acid의 함량을 보여준다. 6% 설탕물을 사용하였을 때 항산화 활성이 높음을 알 수 있다.

도 3은 간 세포인 HepG2 세포에 산화스트레스를 유발하였을 때 들깻잎 추출물의 산화스트레스 억제능을 보여준다. 6% 설탕물을 사용하였을 때 항산화 활성이 높음을 알 수 있다. 대조군으로 설탕물로 재배하지 않은 일반 들깻잎을 사용하였다.

도 4는 간 세포인 HepG2 세포에 들깻잎 추출물을 처리하였을 때, 세포 내 항산화 물질인 glutathione의 함량을 보여준다. 6% 설탕물을 사용하였을 때 glutathione의 함량이 높음을 알 수 있다.

도 5는 간 세포인 HepG2 세포에 산화스트레스를 유발하였을 때, 지질과산화 억제능을 보여준다.

도 6은 랫드에 들깻잎 추출물을 경구투여 하였을 때, 세포 내 항산화 물질인 glutathione의 함량을 보여준다.

도 7은 랫드에 들깻잎 추출물을 경구투여 하였을 때 산화스트레스로 인한 지질과산화 억제능을 보여준다.

도 8은 랫드에 들깻잎 추출물을 경구투여 하였을 때 산화스트레스로 인한 간 조직 손상 억제능을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 목적으로 기재된 것으로, 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0059] 실시예 1. 설탕물을 이용하여 들깻잎(*perilla frutescens*)을 재배

[0060] 밀양농업기술센터에서 동일 구획 내에서 2009년 9월에 파종하여 4%, 6%, 8%의 설탕물을 관수 재배를 통하여 들깻잎을 온실 재배 후 수확한다.

[0061] 실시예 2. 기능성 들깻잎(*perilla frutescens*)으로부터 간 보호 기능물질의 추출

[0062] 건조된 들깻잎(*perilla frutescens*) 100g을 증류수 3 L를 이용하여 3시간 동안 환류냉각 추출하여 얻은 후 7,500 rpm, 30 min, 4℃에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 원심분리된 상등액에 남아 있을지 모르는 불용성 물질을 제거하기 위하여 재차 상등액을 whatman No. 42 여과하였다. 여과된 상등액을 감압증류한 다음 동결건조를 통하여 분말 형태의 들깻잎 추출물(일반 들깻잎 PLE-I, 4% 설탕물 재배 들깻잎 PLE-II, 6% 설탕물 재배 들깻잎 PLE-III, 8% 설탕물 재배 들깻잎 PLE-IV)을 얻었다.

[0063] 실험예 1. 들깻잎 추출물과 기능성 들깻잎 추출물의 항산화 활성 비교

[0064] 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 이용하여 정량 하였다. 즉, 추출물 100 μ L에 folin-ciocalteu reagent 0.25 mL를 가한 후 증류수 0.4 mL을 넣어 희석한 후 20% Na_2CO_3 포화 용액 1.25 mL을 가하여 잘 섞고, 실온에서 40분 방치한 후 흡광광도계를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 갈릭산의 농도를 달리하여 조제한 후 표준 곡선을 작성하여 계산하였다.

[0065] 총 플라보노이드의 함량은 각 추출액 100 μ L에 2% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 용액을 100 μ L 가하고 5분 방치한 후, 흡광도 값 430 nm에서 측정하였다. 표준물질로는 quercetin dihydrate를 사용하였다.

[0066] FRAP reagent로서 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 2.5 mL에 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mL과 pH 3.6의 0.3 M acetate buffer 25 mL을 가하였다. 그 후 FRAP reagent 3 mL에 농도별 들깻잎 추출액 100 μ L를 넣어 혼합한 것을 37℃에서 5분 경과 후에 593 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 곡선으로 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하여 산출하였다.

[0067] Radical scavenging property는 유리기인 DPPH에 대한 소거능을 측정하였다. 에탄올에 녹인 200 μ M DPPH reagent 100 μ L에 농도별 시료 100 μ L를 넣고 잘 섞어주고 어두운 상태로 30분간 보관한 후 515 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였고, 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다. 각 시료의 SC_{50} (scavenging

activity 50%)은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 하였다.

[0068] 또한 Radical scavenging property는 ABTS에 대한 소거능을 측정하였다. ABTS reagent는 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate을 섞어 만들고 어두운 상태에서 하루 동안 방치한 후 사용하였다. ABTS reagent 180 μ L에 농도별 시료 20 μ L를 넣고 어두운 상태에서 6분간 보관한 후 734 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였고, 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다. 각 시료의 SC₅₀(scavenging activity 50%)은 ABTS의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 하였다.

[0069] 하기 표 1에는 각각 군들에 대한 항산화 활성 평가 결과를 나타내었다. 6% 설탕물을 이용하여 재배한 기능성 들깨잎 추출물이 일반 들깨잎 추출물과 4%, 8% 설탕물을 이용한 기능성 들깨잎 추출물보다 높은 항산화 활성이 있음을 확인하였다.

표 1

	Total flavonoid (μ g quercetin / mg DM)	Total polyphenol (μ g GAE / mg DM)	DPPH-SC ₅₀ (μ g DM / ml)	FRAP (mM FeSO ₄ /mg DM)	ABTS-IC ₅₀ (μ g DM / ml)
Control	13.1 $\pm$ 2.04 ^a	39.6 $\pm$ 1.34 ^a	739.7 $\pm$ 62.84 ^a	0.4 $\pm$ 0.01 ^a	601.1 $\pm$ 31.06 ^a
4%	16.1 $\pm$ 4.83 ^a	46.2 $\pm$ 2.78 ^b	225.9 $\pm$ 2.11 ^b	0.7 $\pm$ 0.01 ^b	415.1 $\pm$ 30.29 ^b
6%	26.5 $\pm$ 0.87 ^b	70.9 $\pm$ 1.07 ^c	306.4 $\pm$ 0.28 ^c	1.1 $\pm$ 0.02 ^c	363.6 $\pm$ 19.74 ^c
8%	35.1 $\pm$ 1.18 ^c	59.0 $\pm$ 1.21 ^d	207.5 $\pm$ 13.00 ^d	1.1 $\pm$ 0.02 ^c	491.1 $\pm$ 23.38 ^d

[0070]

[0071] 실험예 2. 들깨잎 추출물과 기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 지표물질 함량 측정

[0072] 들깨잎 추출물과 기능성 들깨잎 추출물로부터 간 보호 지표물질로 알려진 카페인산의 함량을 HPLC를 통하여 측정하였다. 표 2는 추출물로부터 카페인산을 측정하기 위한 HPLC 분석 조건을 보여준다.

표 2

[0073]

종류	Varian Prostar
컬럼	Waters XTerra RP18 컬럼, 5 μ m (4.6 $\times$ 150 mm)
이동상	A: 0.05% trifluoroacetic acid B: MeOH 구배 : A:B = 100:0 $\rightarrow$ 0:100
체류 시간	9 분
유속	1 mL/분
Detector	340 nm

[0074] 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 일반 들깨잎 추출물보다 설탕물로 재배한 기능성 들깨잎 추출물에서 더 높은 카페인산 함량을 확인하였으며, 그 중 6% 설탕물로 재배한 기능성 들깨잎 추출물에서 가장 높은 카페인산 함량을 확인하였다.

[0075] 실험예 2. 들깨잎 추출물과 기능성 들깨잎 추출물의 MTT assay를 통한 간보호 활성 비교

[0076] 간세포 유래 셀인 HepG2 cell에 *t*-BHP(*tert*-butyl hydroperoxide)로 산화적 손상을 유발 한 후, 산화적 손상을

막아줄 것으로 예상하는 간 보호 효과가 있는 들깨잎 추출물과 6% 설탕물로 재배한 기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 효과를 MTT 분석(cell viability, 셀 생존율)을 통하여 확인하였다(도 3 참조). 들깨잎 추출물과 기능성 들깨잎 추출물 모두 간 보호 효과가 있음을 확인하였다. 그러나 6% 설탕물을 이용하여 재배한 기능성 들깨잎 추출물의 간 보호 활성이 일반 들깨잎 추출물보다 높음을 알 수 있다.

[0077] 실험예 3. 들깨잎 추출물과 기능성 들깨잎 추출물의 지질과산화 억제 활성과 GSH 함량 측정을 통한 간보호 활성 비교

[0078] 간세포 유래 셀인 HepG2 cell에 *t*-BHP(*tert*-butyl hydroperoxide)로 산화적 손상을 유발 한 후, 산화적 손상을 막아줄 것으로 예상하는 간 보호 효과가 있는 들깨잎 추출물과 6% 설탕물로 재배한 기능성 들깨잎 추출물의 지질과산화 억제 활성을 측정하였다. *t*-BHP에 의한 산화적 손상으로 인해 대조군의 지질과산화가 증가하지만, 들깨잎 추출물과 기능성 들깨잎 추출물을 처리하였을 때 지질과산화가 억제되는 것을 확인하였다. 그러나 기능성 들깨잎 추출물을 처리하였을 때 일반 들깨잎 추출물보다 높은 지질과산화가 억제되는 것을 확인하였다.

[0079] 간세포 유래 셀인 HepG2 cell에 일반 들깨잎 추출물과 기능성 들깨잎 추출물을 처리하였을 때 세포내 간 보호 활성과 관련된 GSH의 함량을 측정하였다. 대조군에 비하여 일반 들깨잎과 기능성 들깨잎 추출물을 처리하였을 때 대조군에 비하여 GSH의 함량이 증가하는 것을 확인하였고, 기능성 들깨잎 추출물을 처리하였을 때 일반 들깨잎 추출물에 비하여 유의적 수준 차이로 GSH 함량이 증가하는 것을 확인하였다(도 4 참조).

[0080] 실험예 4. *t*-BHP를 주입한 간기능 손상에 있어서 들깨잎 추출물과 기능성 들깨잎 추출물의 간보호 활성 비교

[0081] 실험동물로서 랫트 6마리를 한 군으로 설정하여 본 발명에 따른 들깨잎 추출물과 *t*-BHP를 처리하지 않은 미처리 대조군, *t*-BHP만을 처리한 군, 들깨잎 추출물 1000 mg/kg을 식이에 첨가한 후 *t*-BHP를 처리한 군, 본 발명에 따른 기능성 들깨잎 추출물 1000 mg/kg을 식이에 첨가한 후 *t*-BHP를 처리한 군으로 구분하여 4개의 군을 설정하였다. *t*-BHP는 랫트의 간을 손상시킬 목적으로 사용하였다. 5일간 식이를 조절한 후 미처리 대조군을 제외한 군에 *t*-BHP를 0.5 mmol/kg 처리하고 18시간 경과한 후 해부하고 혈액에서 간 손상 지표인 ALT, AST, LDH를 측정하였고, 간 조직을 적출하여 지질과산화와 GSH를 측정하였다. 또한 hematoxylin & eosin (H&E) staining을 이용하여 간 조직의 손상 정도를 확인하였다.

[0082] 하기 표 3에는 각각의 군들에 대한 평가 결과를 나타내었다. 하기 표 2를 참조하면, 0.5 mmol/kg의 *t*-BHP를 처리한 그룹에서의 AST, ALT, LDH는 처리하지 않은 그룹에 비해 증가했으나, 들깨잎 추출물 1000 mg/kg을 처리한 그룹에서는 감소한 것을 알 수 있으며, 본 발명에 따른 기능성 들깨잎 추출물 1000 mg/kg을 처리한 그룹에서는 대조군과 비슷한 수준으로 감소한 것을 알 수 있다. 또한 하기 표 3을 참조하면, 0.5mmol/kg의 *t*-BHP를 처리한 그룹에서 간 조직의 지질과산화는 처리하지 않은 그룹에 비하여 증가하였으나, 들깨잎 추출물과 본 발명에 따른 기능성 들깨잎 추출물을 처리한 그룹은 감소한 것을 알 수 있다. 간 조직의 GSH 함량은 *t*-BHP를 처리한 그룹에서 감소하였지만, 들깨잎 추출물과 본 발명에 따른 기능성 들깨잎 추출물을 처리한 그룹에서 GSH가 증가한 것을 확인하였다. 또한 일반 들깨잎 추출물과 본 발명에 따른 기능성 들깨잎 추출물을 비교하면 혈액의 AST, ALT, LDH 모두 기능성 들깨잎 추출물에서 높은 간 보호 활성을 확인하였으며, 간 조직의 지질과산화와 GSH 함량 또한 본 발명에 따른 기능성 들깨잎 추출물을 처리하였을 때 일반 들깨잎보다 유의적으로 높은 간 보호 활성을 나타내었다.

[0083] 따라서 본 발명에 따른 기능성 들깨잎 추출물은 *t*-BHP 처리에 따른 간 손상에 대해서 일반 들깨잎 추출물보다 우수한 간 보호 효능을 갖는 것을 알 수 있다.

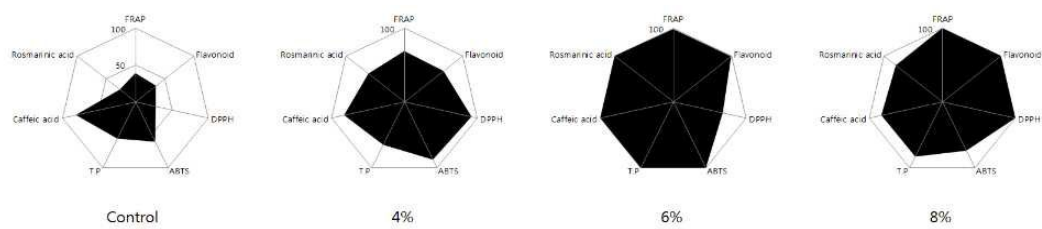
표 3

Treatment	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	LDH(U/L)	MDA (nM/mg protein)	GSH (nM/mg protein)
Control	135.4± 8.11 ^a	31.3± 4.68 ^a	2527.6± 378.56 ^a	256.9±10.99 ^a	155.6±8.95 ^a
<i>t</i> -BHP (0.5mmol/ kg)	304.0± 52.89 ^b	60.7± 6.11 ^b	3945.0± 538.82 ^b	671.4±31.63 ^b	100.7±3.98 ^b
일반 들깨잎 추출물	184.7± 19.86 ^c	36.0± 4.00 ^a	3540.3± 891.72 ^{ab}	491.3±6.46 ^c	266.3±22.89 ^c
기능성 들깨잎 추출물	140.0± 24.00 ^a	37.7± 7.57 ^a	1933.7± 655.38 ^a	382.5±12.69 ^d	286.1±30.55 ^c

[0084]

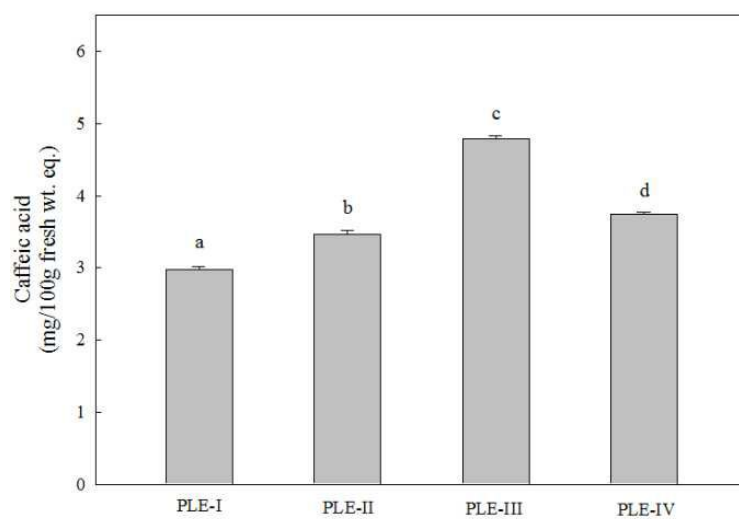
도면

도면1

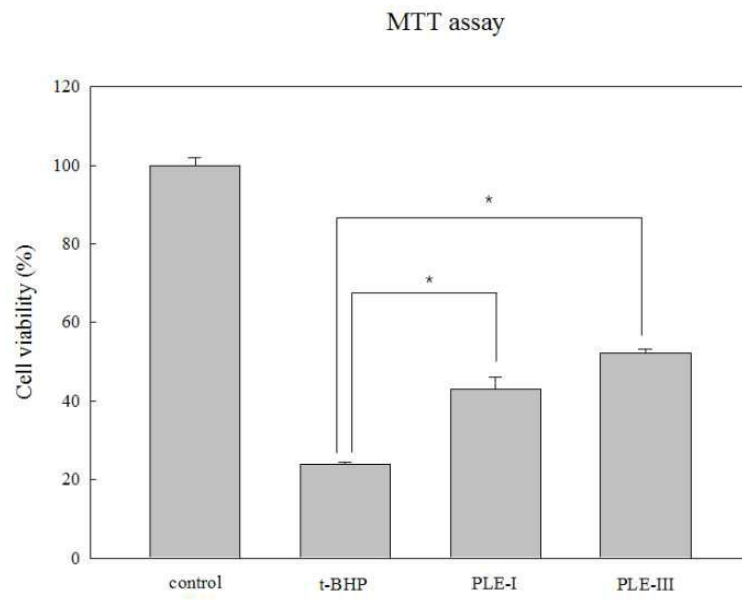


도면2

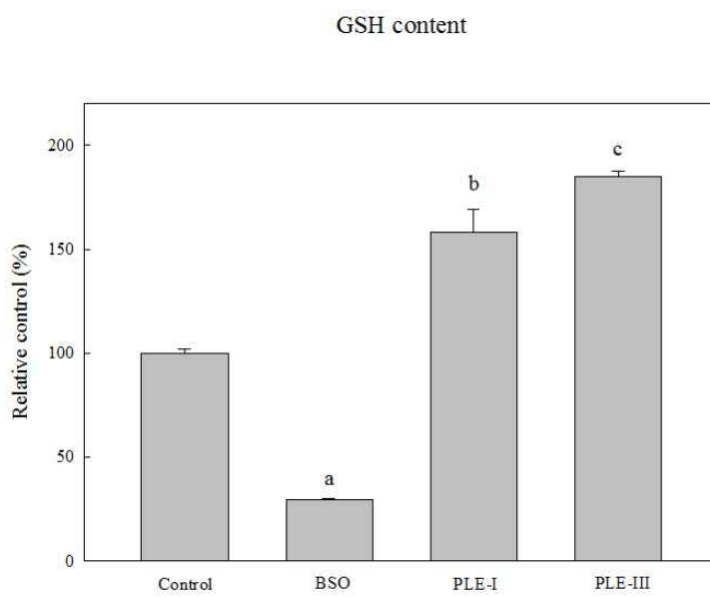
Caffeic acid content



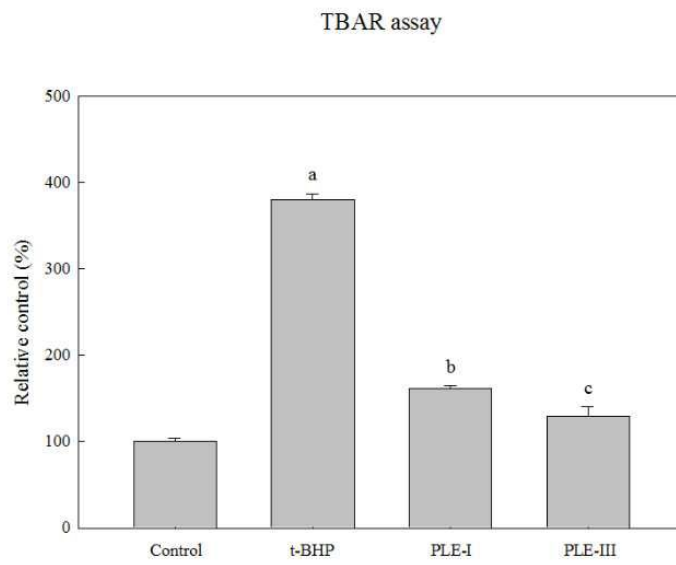
도면3



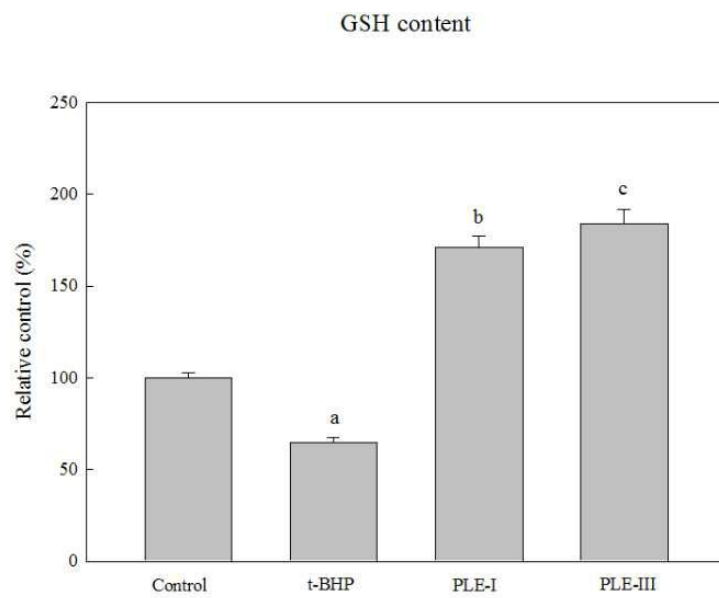
도면4



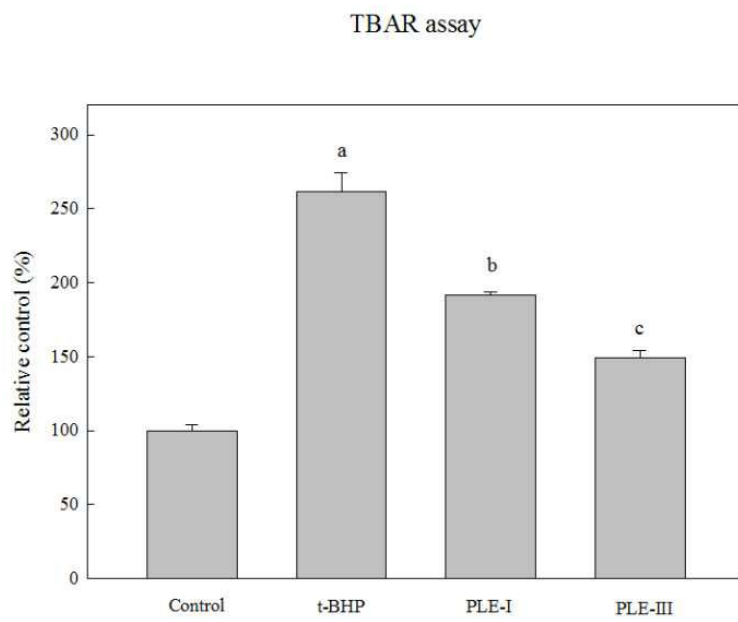
도면5



도면6



도면7



도면8

