



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0111200
(43) 공개일자 2008년12월23일

(51) Int. Cl.

A23L 1/29 (2006.01) *A61K 36/537* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0059264

(22) 출원일자 2007년06월18일

심사청구일자 2007년06월18일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구 달서구 신당동 1000번지

(72) 발명자

이인선

대구광역시 수성구 황금동 368 캐슬골드파크
1416-1803

양선아

대구 수성구 범어4동 서한두레 맨션 102/1002

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인명문

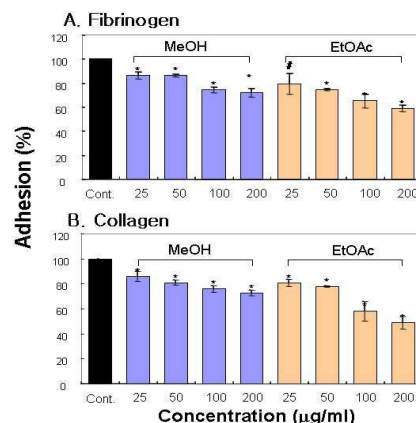
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 단삼 추출물을 포함하는 혈전 형성 예방용 기능성 식품 및 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 단삼 추출물을 포함하는 혈전 형성 예방 및 항산화효능을 갖는 약학 조성물 및 기능성 식품에 관한 것으로, 살비아놀산 B(salvianolic acid B), 로즈마린산(rosmarinic acid) 또는 이들의 혼합물을 활성성분으로 포함하는 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 추출물을 유효성분으로 함유하고, 혈전 형성 예방 및 항산화 효능을 갖는 기능성 식품 및 약학 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

임남경

대구 서구 중리동 중리시영2차 12동 103호

지영주

대구 달성군 화원읍 성산리 태왕주택 106/702

유동찬

대구 남구 봉덕2동 1064-55

지광환

대구 수성구 범어4동 서한두레 맨션 102/1002

특허청구의 범위

청구항 1

살비아놀산 B(salvianolic acid B), 로즈마린산(rosmarinic acid) 또는 이들의 혼합물을 활성성분으로 포함하는 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 추출물과, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함하고 혈전 형성 예방 및 항산화효능을 갖는 기능성 식품.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

단삼 추출물은 단삼의 알코올 추출물을 에틸아세테이트로 추출하여 분획한 에틸아세테이트 분획물인 것임을 특징으로 하는 기능성 식품.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

단삼 추출물은 단삼 추출물 총 중량에 대하여 살비아놀산 B(salvianolic acid B) 50~70중량%, 로즈마린산(rosmarinic acid) 10~30중량% 또는 이들의 혼합물 60~100중량%를 활성성분으로 포함하는 것임을 특징으로 하는 기능성 식품.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

정제, 과립제, 연질캡셀제, 액제 제형, 음료 및 다류 중 선택된 것임을 특징으로 하는 기능성 식품.

청구항 5

살비아놀산 B(salvianolic acid B), 로즈마린산(rosmarinic acid) 또는 이들의 혼합물을 활성성분으로 포함하는 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 추출물을 유효성분으로 함유하고, 혈전 형성 예방 및 항산화 효능을 갖는 약학 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

단삼 추출물은 단삼의 알코올 추출물을 에틸아세테이트로 추출하여 분획한 에틸아세테이트 분획물인 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

단삼 추출물은 단삼 추출물 총 중량에 대하여 살비아놀산 B(salvianolic acid B) 50~70중량%, 로즈마린산(rosmarinic acid) 10~30중량% 또는 이들의 혼합물 60~100중량%를 활성성분으로 포함하는 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

단삼 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 함량이 0.5중량% 이상인 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

살비아놀산 B(salvianolic acid B)는 조성물 총 중량에 대하여 함량이 0.5중량% 이상인 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 10

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

로즈마린산(rosmarinic acid)은 조성물 총 중량에 대하여 함량이 1.5중량% 이상인 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 단삼 추출물을 포함하는 혈전 형성 예방 및 항산화효능을 갖는 기능성 식품 및 약학 조성물에 관한 것이다.
- <8> 사람의 몸은 상처부위의 치료와 혈액의 손실을 막기 위한 생체 시스템을 가지고 있으며, 이것은 혈소판과 혈장의 응고, 섬유소 분해, 그리고 응고억제라고 하는 복잡한 과정의 조절과 균형으로 이루어진다. 그러나 여러 가지 요인으로 이러한 평형상태가 깨지면 혈액의 흐름이 장애를 받아 심혈관계 질환 등의 혈전질환이 생긴다. 이러한 혈전은 동맥, 정맥, 모세혈관 또는 심장 등 순환기계 어느 곳에서도 발생할 수 있으며 대표적인 심혈관계 질환인 동맥경화증은 심근경색이나 뇌경색을 일으키는 매우 위험한 질환이다.
- <9> 혈전의 초기단계는 상처부위의 과도한 지혈작용과 혈관 내피세포의 손상 등의 원인에 의해 혈소판이 점착, 활성화, 응집되면서 시작되며, 혈액응고계를 활성화시키면서 급속히 촉진된다.
- <10> 정상의 혈관 내피세포는 일산화질소(nitric oxide(NO))와 프로스타시클린(prostacyclin(PGI₂))과 같은 억제인자를 방출하여 혈관벽을 보호함으로써 혈소판의 부착과 활성화를 억제하는 작용을 하지만 내피세포가 손상되면 혈관내피 세포 아래쪽에 위치하고 있는 콜라겐(collagen)이 노출되어 혈중에 순환하는 본 빌리브란트 인자(vWF; von Willebrand factor)들이 먼저 콜라겐(collagen)에 붙고 혈소판이 vWF 수용체(vWF receptor, GP Ib/IX/V)를 통해 그 위에 달라붙는다. 이 과정에서 혈소판은 활성화되고, 혈소판내의 그레놀(granule)로부터 ADP와 트롬복산 A₂(thromboxane A₂(TXA₂)) 등이 분비되어 주위 혈소판의 활성을 유도한다. 활성화된 혈소판의 막에 존재하는 피브리노겐(fibrinogen) 수용체인 GP IIb/IIIa 수용체와 피브리노겐(fibrinogen)이 결합하여 혈소판 응고가 촉진된다.
- <11> 현재 혈전질환의 예방과 치료에는 항혈소판제, 항응고제, 형성된 혈전을 치료하기 위한 혈전용해제 등이 사용되고 있다. 대표적인 항혈소판제제인 아스피린은 효과는 뛰어나지만 위장관 출혈과 소화성궤양 등의 부작용을 일으키며, 그 외의 항응고제나 고지혈증 치료제로 쓰이는 약물들은 가격이 너무 고가인 문제가 있다. 따라서 혈전 형성의 예방을 위하여 혈소판의 활성화 및 응고의 억제, 혈전의 용해 활성을 가진 천연물 성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- <12> 단삼(danshen, *Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생식물로, 한방에서 부인의 생리불순, 생리통, 산후복통 및 어혈성의 심복부동통, 타박상의 치료와 불면증, 피부발진 등의 약재로 쓰인다.
- <13> 단삼의 주요 화학성분으로는 탄시논(tanshinone) I, IIa, IIb 등을 포함하는 디테펜(diterpene) 화합물과, 살비안산 A(salvianic acid A), 프로토크테퀴알데히드(protocatechuic aldehyde), 살비아놀산 B(salvianolic acid B) 등을 포함하는 페놀 화합물(phenolic compound), 그 외에 바이칼린(baicalein), β-시토스테롤(β-sitosterol), 우솔릭산(ursolic acid), 비타민 E(vitamin E)와 타닌(tannin) 등이 알려져 있다.
- <14> 단삼의 밝혀진 생리활성으로는 항균, 항산화, 항암, 항돌연변이, 단삼유래 마그네슘 살비아놀레이트(magnesium salvianolate 또는 magnesium lithospermate)의 간염에의 효과가 알려져 있으며, 항혈전 효능에 대해서는 항응고제로 많이 사용되는 와파린(warfarin)의 작용을 증진시키는 것이 시사되었으나 기전에 관한 연구는 부족한 실정이다.
- <15> 대한민국 특허공개 제2007-27532호에는 단삼과 삼칠을 이용하여 심혈관성 질환 및 뇌혈관성 질환 치료용 한약 조성물 및 그 제조방법이 기재되어 있다. 여기에는 단삼과 삼칠의 추출물을 포함하는 한약 조성물이 심근경색

선, 혈소판 응집 억제, 혈전형성저해, 고지혈증방지 등의 효과가 있음을 확인하고, 한약 조성물의 성분을 검출하고 있으나, 구체적으로 어떤 성분이 어떤 효과를 나타내는 것인지는 알 수 없다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <16> 본 발명자들은 단삼 추출물을 증류수에 녹여 분획한 분획물 중 에틸아세테이트 분획물이 단삼 추출물보다 혈전 형성 예방의 효과와 더불어 항산화 효능이 우수한 것을 발견하고, 이러한 효능을 제공하는 에틸아세테이트 분획물의 주요 폴리페놀화합물이 살비아놀산 B 및 로즈마린산인 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- <17> 따라서 본 발명은 혈소판의 응집 및 혈소판의 부착을 효과적으로 억제하여 혈전 형성을 예방하는 기능성 식품을 제공하고자 한다.
- <18> 한편 본 발명은 항산화 효능을 갖는 기능성 식품을 제공하고자 한다.
- <19> 아울러 본 발명은 혈소판의 응집 및 혈소판의 부착을 효과적으로 억제하여 혈전 형성을 예방하는 약학 조성물을 제공하고자 한다.
- <20> 또한 본 발명은 항산화 효능을 갖는 약학 조성물을 제공하고자 한다.
- <21>

발명의 구성 및 작용

- <22> 이에 본 발명은 바람직한 구현예로서 살비아놀산 B(salvianolic acid B), 로즈마린산(rosmarinic acid) 또는 이들의 혼합물을 활성성분으로 포함하는 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 추출물과, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함하고 혈전 형성 예방 및 항산화효능을 갖는 기능성 식품을 제공할 수 있다.
- <23> 상기 구현예에서 단삼 추출물은 단삼의 알코올 추출물을 에틸아세테이트로 추출하여 분획한 에틸아세테이트 분획물인 것일 수 있다.
- <24> 상기 구현예에서 단삼 추출물은 단삼 추출물 총 중량에 대하여 살비아놀산 B(salvianolic acid B) 50~70중량%, 로즈마린산(rosmarinic acid) 10~30중량% 또는 이들의 혼합물 60~100중량%를 활성성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- <25> 상기 구현예에서 기능성 식품은 정제, 과립제, 연질캡슐제, 액제 제형, 음료 및 다류 중 선택된 것일 수 있다.
- <26> 본 발명은 바람직한 다른 구현예로서 살비아놀산 B(salvianolic acid B), 로즈마린산(rosmarinic acid) 또는 이들의 혼합물을 활성성분으로 포함하는 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 추출물을 유효성분으로 함유하고, 혈전 형성 예방 및 항산화 효능을 갖는 약학 조성물을 제공할 수 있다.
- <27> 상기 구현예에서 단삼 추출물은 단삼의 알코올 추출물을 에틸아세테이트로 추출하여 분획한 에틸아세테이트 분획물일 수 있다.
- <28> 상기 구현예에서 단삼 추출물은 단삼 추출물 총 중량에 대하여 살비아놀산 B(salvianolic acid B) 50~70중량%, 로즈마린산(rosmarinic acid) 10~30중량% 또는 이들의 혼합물 60~100중량%를 활성성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- <29> 상기 구현예에서 단삼 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 함량이 0.5중량% 이상인 것일 수 있다.
- <30> 상기 구현예에서 살비아놀산 B(salvianolic acid B)는 조성물 총 중량에 대하여 함량이 0.5중량% 이상인 것일 수 있다.
- <31> 상기 구현예에서 로즈마린산(rosmarinic acid)은 조성물 총 중량에 대하여 함량이 1.5중량% 이상인 것일 수 있다.
- <32> 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- <33> 본 발명은 단삼으로부터 에틸아세테이트 분획물, 살비아놀산 B(salvianolic acid B) 및 로즈마린산(rosmarinic acid)을 다음과 같이 수득할 수 있다.
- <34> 단삼을 구하여 수세 및 건조 후 무게의 5~20배량(w/v)의 용매로 20시간~30시간 정치하여 2~5회 반복하여 추출하고, 추출액을 1~3회 여과하여 상등액을 농축함으로써 단삼 추출물을 수득한다. 상기 용매로는 물 또는 알코올을

사용할 수 있다.

- <35> 수득된 단삼 추출물을 증류수에 녹인 후 에틸아세테이트 용매로 추출하여 통상의 분획공정을 거쳐 에틸아세테이트 분획물을 얻고, HPLC를 수행하여 살비아놀산 B 및 로즈마린산을 분리 정제할 수 있다. 에틸아세테이트 분획물에서는 살비아놀산 B(salvianolic acid B)가 50~70중량% 검출되었으며, 로즈마린산(rosmarinic acid)은 10~30중량% 검출되었다.
- <36> 본 발명의 약학 조성물과 식품 조성물은 살비아놀산 B, 로즈마린산 또는 이들의 혼합물을 활성성분으로 포함하는 단삼 추출물을 유효성분으로 함유하여, 혈전 예방 및 항산화 효과를 제공한다. 이를 위하여 에틸아세테이트 분획물 자체를 조성물 중 포함할 수도 있으며, 이로부터 분리 정제된 살비아놀산 B 또는 로즈마린산 각각을 단일성분으로 포함하거나, 이들의 혼합물을 포함할 수도 있다. 따라서 본 발명의 약학 조성물 및 식품 조성물에 포함되는 단삼 추출물은 단삼 추출물 총 중량에 대하여 활성성분으로 살비아놀산 B를 50~70중량%, 로즈마린산을 10~30중량% 포함하는 것이며, 이들의 혼합물 60~100중량%를 포함할 수도 있다.
- <37> 본 발명의 단삼 추출물로서 에틸아세테이트 분획물은 실험시 최종농도 100 μ g/ml 이상에서 혈소판 응집 억제 및 항산화 효과 측면에서 특히 유효하였으며, 이를 포함하는 본 발명의 약학 조성물은 인체에 흡수되는 정도를 고려하여 목적하는 혈소판 응집 억제 및 항산화 효과가 발현될 수 있도록, 조성물 총 중량에 대하여 에틸아세테이트 분획물을 0.5중량% 이상, 바람직하게는 5중량% 이상 포함하는 것이 좋다.
- <38> 또한 살비아놀산 B는 100 μ g/ml 이상에서, 로즈마린산은 실험시 최종농도 300 μ g/ml 이상에서 혈소판 응집 억제 및 항산화 효과 측면에서 특히 유효하였으며, 이를 포함하는 본 발명의 약학 조성물은 인체에 흡수되는 정도를 고려하여 목적하는 혈소판 응집 억제 및 항산화 효과가 발현될 수 있도록, 조성물 총 중량에 대하여 살비아놀산 B를 조성물 총 중량에 대하여 0.5중량% 이상, 더욱 바람직하게는 5중량% 이상 포함하는 것이 좋으며, 로즈마린산을 조성물 총 중량에 대하여 1.5중량% 이상, 더욱 바람직하게는 15중량% 이상 함유하는 것이 혈소판 응집 억제 효과 및 항산화 효과의 측면에서 바람직하다.
- <39> 상기 약학 조성물은 약학 조성물 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상적인 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 시럽 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 주사제 등의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다.
- <40> 본 발명의 약학 조성물은 약학적 투여 형태가 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합 뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- <41> 또한 본 발명은 단삼 추출물로부터 분리 정제된 살비아놀산 B, 로즈마린산 및 이들의 혼합물과, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함하여 혈전 예방 및 항산화 효능이 있는 기능성 식품을 제공한다.
- <42> 기능성 식품은 바람직하게는 정제, 과립제, 연질캡셀제, 액제 제형, 음료 및 다류 중 선택된 것일 수 있으며, 이때 인체에 흡수되어 혈소판 응집 억제 및 항산화 효능이 발현될 수 있도록, 단삼 추출물로서 에틸아세테이트 분획물을 식품 조성물 총 중량에 대하여 5중량% 이상 포함하는 기능성 식품을 제공하여 목적하는 혈소판 응집 억제 및 항산화 효과를 제공할 수 있다. 또한 목적하는 혈소판 응집 억제 및 항산화 효과를 제공하기 위하여 살비아놀산 B를 식품 조성물 총 중량에 대하여 5중량% 이상 함유하는 식품 조성물을 제공할 수 있으며, 로즈마린산은 식품 조성물 총 중량에 대하여 15중량% 이상 함유하는 것이 바람직하다.
- <43> 상기 기능성 식품은 살비아놀산 B 또는 로즈마린산의 필수 성분 외 다른 성분은 특별한 제한이 없으며, 통상의 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제로써 식품별로 필요한 성분을 추가로 함유할 수 있다.
- <44> 한편, 단삼은 오랫동안 생약으로 사용되어 오던 약재로서 이로부터 추출된 단삼 추출물은 독성 및 부작용의 문제가 없으므로 단삼 추출물과 단삼 추출물로부터 분리 정제된 살비아놀산 B 및 로즈마린산 역시 독성 및 부작용의 문제가 없으며, 함량을 늘릴수록 함량 증가에 대하여 비례하는 수준으로 목적하는 효과 역시 증가하다가 일정 수준 이상에서는 효과 증가는 완만해졌다.
- <45> 이하, 본 발명을 하기의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명하기로 하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명이 하기의 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

<46> **<실시예 1> 단삼 추출물 제조**

- <47> 건조 상태의 단삼 1kg을 구입하여 가볍게 수세하여 건조한 후, 단삼 무게의 10배량(w/v)의 80% 메탄올을 가하여 24시간 동안 정치하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No.3, England)를 사용하여 2회 여과

하고, 상등액은 rotary vacuum evaporator (R-3000, Buchi Switzerland)로 55℃에서 농축한 후 동결건조하여 단삼 추출물 396.2g을 수득하였다.

<48> **<실시예 2~6> 분획물 제조**

<49> 실시예 1에서 수득된 단삼 추출물을 건조중량의 20배(w/v)증류수에 녹인 후 헥산 (n-hexane, Hexane), 클로로포름 (chloroform, CHCl₃), 에틸아세테이트(ethyl acetate, EtOAc), 부탄올 (butanol, BuOH) 을 순차적으로 3회 반복 추출하여 각 용매별로 계통적 분획을 하였고, 분획 후 마지막 남은 물층을 rotary vacuum evaporator (R-3000, Buchi Switzerland)로 55℃에서 농축하여 용매를 완전히 제거한 후 동결건조하여 헥산 분획물(실시예 2), 클로로포름 분획물(실시예 3), 에틸아세테이트 분획물(실시예 4), 부탄올 분획물(실시예 5), 및 물 분획물(실시예 6)을 얻었다.

<50> **<실험예 1> 혈소판 응집 억제 작용 확인**

<51> **(1) 실험 동물 및 혈소판 준비**

<52> (주)오리엔트바이오에서 분양받은 Sprague-Dewley rat을 1주 이상 실험실 환경에 적응시켜 스트레스를 최소화하고, 몸무게 230-270g의 수컷(male)을 실험에 사용하였다.

<53> 준비된 rat을 에틸에테르(ethyl ether)로 마취하고, 복대동맥으로부터 채혈하여 항응고제로서 0.15M의 구연산나트륨(sodium citrate)을 혈액에 대하여 1:9(v/v)의 비율이 되도록 사용하였다. 혈액을 200×g에서 10분간 원심 분리하여 상등액의 혈소판풍부혈장(PRP; Platelet rich plasma)을 얻었고, 계속하여 800×g에서 15분간 원심 분리하고, 침전된 혈소판을 세척완충액(washing buffer, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)로 2회 세척한 후, 현탁완충액(suspension buffer, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)에 현탁시켜서 세척 혈소판(washed platelet)으로 하였다.

<54> 혈소판 응집 억제능에 사용한 세척 혈소판(washed platelet)은 세포수 측정기(cell counter, Hema-vet HV950FS, Drew scientific, USA)를 이용하여 혈소판 수를 측정하고 완충액(buffer, 37 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES, 0.25% BSA, pH 7.4)으로 희석하여 혈소판이 3×10⁸ platelet/mL이 되도록 조정하였다. 혈소판은 저온에서 응집되므로 이상의 실험은 상온에서 실행하였다.

<55> **(2) 혈소판 응집 억제능 측정**

<56> 1) rat의 혈소판 응집 억제능은 측정계(Aggregometer, Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA. USA)를 이용한 탁도 측정법으로 측정하였다. 세척 혈소판(Washed platelet)을 37℃에서 3분간 인큐베이션(incubation) 시킨 후, 상기 실시예 1 내지 실시예 6에서 수득한 단삼 추출물 및 분획물을 시료로 하여 2분간 전처리한 후, 혈소판 응집을 유도하는 물질 ADP(6 mM), collagen(2 mg/mL)으로 응집을 유도하였으며, 10분간 측정 후 억제정도(inhibition,%)를 계산하였다. 억제정도(inhibition,%)는 시료를 처리하지 않은 것을 control(비교예 1)로 하여, 다음 수학적 식 1과 같은 방법으로 구하였으며, 결과는 하기 표 1과 같다.

<57> **수학적 식 1**

$$Inhibition(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

<58>

<59> 상기 식에서, A : control의 aggregation(%), B : 시료 처리시의 aggregation(%)

표 1

시료(samples)		Aggregation (%)		Inhibition (%)	
		ADP	Collagen	ADP	Collagen
비교예1	Control	75.33±1.53	76.00±1.73	0	0
실시예1	MeOH extract	62.33±3.06	32.33±4.04	17.26	57.46
실시예2	Hexane fraction	—	—	—	—
실시예3	Chloroform fraction	—	—	—	—
실시예4	Ethyl acetate fraction	16.33±2.31	6.67±1.15	78.32	91.23
실시예5	Butanol fraction	40.33±4.62	16.00±1.73	46.46	78.95
실시예6	Water fraction	64.67±1.53	61.33±1.53	14.16	19.3

<60>

<61>

측정 결과, 실시예 1의 단삼의 메탄올추출물에 비해서 실시예 4의 에틸아세테이트 분획물에서 ADP와 collagen으로 유도된 혈소판 응집이 각각 78.32%, 91.23% 억제된 것을 볼 수 있다.

<62>

2) 또한 1)에서와 같이 rat의 혈소판 응집 억제능은 측정계(Aggregometer, Chrono-Log Co., Ltd., Havertown, PA, USA)를 이용한 탁도 측정법으로 측정하였다. 세척 혈소판(Washed platelet) 500 mL를 37℃에서 3분간 인큐베이션(incubation) 시킨 후, 상기 실시예 1 내지 6에서 수득한 단삼 추출물 및 분획물 시료용액 5~50 mg/mL DMSO 1mL로 2분간 전처리한 후, 혈소판 응집을 유도하는 물질 ADP(6 mM), collagen(2 mg/mL)으로 응집을 유도하였으며, 10분간 측정 후 억제정도를 계산하였다. 농도별로 억제 정도를 계산하여 억제를 50% 유도하는 IC₅₀ 값을 계산하였으며, 시료로 아스피린을 사용한 경우를 비교예 2로 하여 측정 결과를 비교하였으며, 그 결과는 하기 표 2와 같다.

표 2

Agonist	IC ₅₀ (mg/mL)		
	실시예 1 Methanol extract	실시예 4 Ethyl acetate fraction	비교예 2 Aspirin
ADP	0.42 ± 0.01	0.03 ± 0.01	No effect
Collagen	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.10

<63>

<64>

측정 결과, 단삼은 ADP와 collagen에 의한 응고에서 서로 다른 IC₅₀ 값을 나타내었으며, 에틸아세테이트 분획물의 억제효과가 메탄올추출물보다 월등히 높아진 것을 알 수 있다. 또한 대조구인 비교예 2의 아스피린과는 다른 방식으로 저해하는 것을 알 수 있다.

<65>

(3) 혈소판 부착 억제능 측정

<66>

(1)에서 수득한 세척 혈소판 현탁액을 각 시료와 37℃에서 10~30분간 보관한 후, 콜라겐(collagen)이나 피브리노젠(fibrinogen)으로 코팅한 96-well plate에 transfer하여 트롬빈(thrombin)으로 활성화 시켰다. 37℃에서 1시간동안 인큐베이션(incubation) 한 후 96-well plate를 PBS로 3회 세척하였다. 이에 따라 96-well plate 바닥에 부착하지 않은 혈소판은 세척 과정에서 제거되고, 부착된 혈소판은 BCA(bicinchoninic acid working solution)에 현탁시켜서 37℃에서 1시간 보관한 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<67>

측정 결과는 도 1에 나타내었으며, 단삼 메탄올추출물과 에틸아세테이트 분획물의 혈소판 부착에 대한 억제효과를 테스트한 결과, 사용한 농도 범위에서 모두 농도 의존적으로 억제효과가 있으며, 응집억제와 마찬가지로 에틸아세테이트 분획물에서 억제 정도가 유의적으로 증가하였다. 그리고 단삼 메탄올추출물과 에틸아세테이트 분획물 모두 혈소판 부착 억제효과가 효과적으로 증가한 범위는 농도가 100μg/mL인 것임을 알 수 있다. 특히 에틸아세테이트 분획물이 100μg/mL 이상일 때 콜라겐에 대한 부착 억제효과가 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있다.

<68>

<실험예 2> 항산화 효능 확인

<69>

(1) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

- <70> 항산화 성분의 함량과 항혈소판 효과와의 관계를 검토하기 위하여 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량을 조사하였다.
- <71> 1) 총 폴리페놀 함량 측정
- <72> 시료를 농도별로 희석한 희석액 2 mL에, 2배로 희석한 Folin 시약 2 mL을 첨가하고, 3분간 반응 시킨 후 10 % Na₂CO₃ 2 mL을 서서히 가하였다. 이를 실온에서 1시간 반응한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 타닌산(tannic acid)를 이용하여 작성한 표준곡선으로 함량을 구하였다.
- <73> 2) 총 플라보노이드 함량 측정
- <74> 각 시료 0.1 mL를 80% 에탄올(ethanol) 0.9 mL에 희석한 후 0.1 mL를 취하여 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다, 이때 total flavonoid 함량은 케르세틴(querceetin)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.
- <75> 상기 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정 결과는 하기 표 3과 같다.

표 3

시료		Total polyphenols (mg/g)	Total flavonoids (mg/g)
실시예1	MeOH extract	84.53±4.47	3.96±0.34
실시예2	Hexane fraction	54.25±3.61	37.38±1.31
실시예3	Chloroform fraction	54.72±7.6	13.96±0.8
실시예4	Ethyl acetate fraction	578.33±42.7	29.36±1.29
실시예5	Butanol fraction	251.34±11.12	5.24±1.08
실시예6	Water fraction	60.93±7.67	1.29±0.14

- <77> 측정 결과, 실시예 4의 에틸아세테이트 분획물이 폴리페놀의 함량이 월등히 높은 것을 볼 수 있으며, 총 플라보노이드 함량 역시 높은 것을 볼 수 있다.

<78> (2) DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거 활성 측정

- <79> 단삼의 항산화능을 알아보기 위해 DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였다.

<80> 1) DPPH free radical-scavenging 활성 측정

- <81> 시료의 free radical 소거 활성은 stable radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 환원력을 측정한 것으로, 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 0.8 mL와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 0.2 mL를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀ 값으로 나타내었다. 이때 상대활성의 비교를 위하여 대조군으로 부틸히드록시아니솔(BHA;Butylated Hydroxy Anisole)을 비교예 3으로 사용하였으며, 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

<82> 2) ABTS radical-scavenging 활성 측정

- <83> ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+ cation decolourisation assay방법(Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. 26: 1231-1237 (1999))에 의하여 시행하였다. 14 mM ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 용액과 4.95 mM 과황산칼륨을 1:1로 섞고 실온 어두운 곳에서 24시간 보관하여 ABTS radical을 만들고, ABTS radical은 732nm에서 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.4)로 희석하여 사용하였다. 희석된 용액 990μl와 10μl의 ABTS radical 을 섞고 1분 후 732 nm에서 흡광도를 측정하여 RC₅₀ 값으로 나타내었으며, 트롤록스(Trolox)를 비교예 4로 하여 대조군으로 사용하였으며, 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

시료(Sample)		RC ₅₀ (mg/mL)	
		DPPH	ABTS
실시예1	MeOH extract	18.7±6.5	54.7±3.5
실시예2	Hexane fraction	68.2±7.1	113.2±19.1
실시예3	Chloroform fraction	47.6±13.6	74.4±10.4
실시예4	Ethyl acetate fraction	2.4±1.5	27.8±1.4
실시예5	Butanol fraction	5.1±0.1	35.8±3.8
실시예6	Water fraction	38.3±15.1	110.9±21.7
비교예3	BHA	5.5±0.1	-
비교예4	Trolox (30mM)	-	18.6±0.3

<84>

<85>

측정 결과, 단삼 메탄올 추출물과 분획물들은 사용된 범위 내에서 농도 의존적으로 라디칼 소거(radical-scavenging) 효과를 나타냈으며, 에틸아세테이트층에서 DPPH 라디칼에 대한 RC₅₀값은 2.4 mg/mL로 BHA보다 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다. ABTS 라디칼에 대해서도 비교적 높은 항산화 효과가 있었다.

<86>

<실험예 3> 에틸아세테이트 분획물의 주성분 확인

<87>

단삼 추출물 중 에틸아세테이트 분획물의 혈전 형성을 예방하는 효과와 항산화 효과를 제공하는 기전을 알아보기 위하여 다음과 같이 분석하였다.

<88>

(1) HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 분석

<89>

HPLC 기기는 Shimadzu의 HPLC Prominence를 이용하여 YMC C18 column (5mm, 10mmx 4.6mm)을 40℃에서 사용하였으며, buffer A (0.026% 인산과 물)와 buffer B (아세트니트릴)를 gradient로 하여 1.0 mL/min의 유속으로 40 분간 분석하였다. 검출은 UV-VIS detector(SPD-20A)를 사용하여 파장 288nm에서 행하였다. 대조군의 용액은 메탄올에 녹여서 15μl를 주입하였으며, 실시예 4의 에틸아세테이트 분획물을 디메틸설폭사이드(DMSO, Dimethylsulfoxide)에 녹인 stock solution을 이동상으로 희석하여 10 mg/mL의 농도로 준비, 15μl를 주입하여 분석하였으며, 그 결과는 도 2와 같다. 이동상의 gradient 조건을 요약하면 표 5와 같다.

표 5

<90>

Time (min)	Buffer A (%)	Buffer B (%)
0	100	0
12	88	12
20	80	20
30	70	30
31	100	0
40	100	0

<91>

에틸아세테이트 분획물의 HPLC 분석을 수행한 결과, 정체시간(retention time)이 25.28분인 로즈마린산(rosmarinic acid)과 29.00분인 살비아놀산 B(salvianolic acid B)의 2개의 main peak를 확인하였으며, 그 비율은 시료 15μl 중 각각 30 nmole과 68 nmole 존재하였다.

<92>

(2) 자외선/가시광선 분광 및 형광분광광도계 분석

<93>

에틸아세테이트 분획물에서 검출된 로즈마린산(rosmarinic acid)과 살비아놀산 B(salvianolic acid B)가 기준 물질인 로즈마린산(rosmarinic acid)과 살비아놀산 B(salvianolic acid B)과의 광학적 특성이 동일한지 여부를 UV-Visible spectrometer(Agilent, US/8453)와 Spectrofluoro photometer(Shimadzu, RF-5301(PC))를 이용하여 확인하였으며, 그 결과는 각각 도 3 및 도 4와 같다.

<94>

도 3은 본 발명의 실시예 4에서 검출된 로즈마린산과 살비아놀산 B 및 기준 물질인 로즈마린산과 살비아놀산 B의 UV-Visible 흡광도를 나타낸 그래프이다. 로즈마린산(rosmarinic acid)과 살비아놀산 B(salvianolic acid B)의 최대 흡수 파장은 각각 326 nm와 286 nm로 기준물질들과 동일하며, 다른 파장 대에서의 흡수도 또한 유사

하게 나타났다.

<95> 도 4는 본 발명의 실시예 4에서 검출된 로즈마린산과 살비아놀산 B 및 기준 물질인 로즈마린산과 살비아놀산 B의 형광스펙트럼 결과를 나타낸 그래프이다. 형광스펙트럼 결과, 분획물(fraction)과 기준물질의 스펙트럼(spectra)의 패턴이 일치하는 것을 알 수 있다.

<96> **<실험예 4> 에틸아세테이트 분획물의 주성분의 혈소판응집 억제능 확인**

<97> 단삼 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 주성분인 로즈마린산과 살비아놀산 B에 대하여 혈전 형성의 초기 단계인 혈소판 응집 억제능을 다음과 같이 테스트하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

<98> 실시예 1의 1)에서와 같이 준비한 rat의 세척 혈소판(Washed platelet)을 37℃에서 3분간 인큐베이션(incubation) 시킨 후, 로즈마린산 및 살비아놀산 B의 표준품을 시료로 하여 최종농도 100mg/mL가 되도록 2분간 전처리한 후, 혈소판 응집을 유도하는 물질 ADP(6 mM)로 응집을 유도하여 응집억제 효과를 테스트하였다. 측정 결과, 로즈마린산은 39% 응집억제효과를 나타냈으며, 살비아놀산 B는 73% 응집억제효과를 나타내어, 대조군에 비해서 로즈마린산과 살비아놀산 B에서 ADP로 유도된 혈소판 응집이 각각 61%, 27% 정도로 억제된 것을 볼 수 있다. 살비아놀산 B가 로즈마린산의 2배 이상의 혈소판응집 억제 효과가 있는 것을 알 수 있다.

<99> 한편, 로즈마린산과 살비아놀산 B의 농도를 변화시키면서 상기 실험예 4와 같은 방법으로 혈소판 억제효과를 측정한 결과, 살비아놀산 B는 최종농도 10μg/mL인 것부터 효과를 나타내었으며, 유효한 효과를 보이는 최종농도는 100μg/mL였고, 로즈마린산은 최종농도가 80μg/mL인 것부터 농도의존적으로 효과를 보였으며, 유효한 효과를 보이는 최종농도는 300μg/mL였다.

<100> **<실시예 5> 급성독성 실험**

<101> ICR계 마우스와 스프라그 도울리 rat(Sprague Dawley, 중앙실험동물)를 각각 10마리씩 8군으로 나누어 본 발명의 실시예 1의 단삼 추출물 및 실시예 4의 에틸아세테이트 분획물을 100mg/mL, 1,000mg/mL, 10,000mg/mL 및 50,000mg/mL의 용량으로 경구투여한 후 2주간 독성여부를 관찰한 결과 8군 모두에서 사망한 예가 한 마리도 없었고, 외견상 대조군과 별다른 증상을 찾아볼 수 없었다.

<102> **<제조예 1> 음료의 제조**

<103> 실시예 4에서 제조한 단삼 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 동결건조하여 분말화한 단삼 추출물 분말 20중량%, 비타민B₁염산염 0.00075중량%, 비타민B₂인산에스테르나트륨 0.00075중량%, 비타민B₆염산염 0.00045중량%, 엽산 0.00005중량%, 니코틴산아미드 0.003중량%, 구연산 0.095중량%, 당류 25.3중량% 및 정제수 54.6중량%를 혼합하여 여과하는 단계와 이들 혼합물을 90℃이상에서 20초간 살균하여 충전한 후 85℃에서 30분간 살균하여 음료를 제조하였다.

<104> **<제조예 2> 정제의 제조**

<105> 실시예 4에서 제조한 단삼 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 동결건조하여 분말화한 단삼 추출물 분말 40mg, 유당 100mg, 전분 100mg을 혼합하고 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<106> **<제조예 3> 과립제의 제조**

<107> 실시예 4에서 제조한 단삼 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 동결건조하여 분말화한 단삼 추출물 분말 35중량%, 비타민C 0.3중량%, 포도당 28중량%, 텍스트린 28중량%, 70% 에탄올 8.7중량%를 함께 반죽하고 과립제조기를 통과시켜 과립 60mesh의 과립을 제조하였다.

<108> **<제조예 4> 캡슐제의 제조**

<109> 실시예 4에서 제조한 단삼 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 동결건조하여 분말화한 단삼 추출물 분말 20mg, 유당 50mg, 전분 50mg, 탈크 2mg을 혼합하고, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

발명의 효과

<110> 이상에서 설명한 바와 같이 본 발명은 혈소판의 응집 및 혈소판의 부착을 효과적으로 억제하여 혈전 형성을 예방하는 기능성 식품을 제공하였다.

<111> 한편 본 발명은 항산화 효능을 갖는 기능성 식품을 제공하여, 식품으로써의 일상적인 섭취가 가능하도록 하여

노화를 방지하고 각종 질병을 예방할 수 있다.

<112> 또한 본 발명은 혈소판의 응집 및 혈소판의 부착을 효과적으로 억제하여 혈전 형성을 예방하는 약학 조성물을 제공하였다.

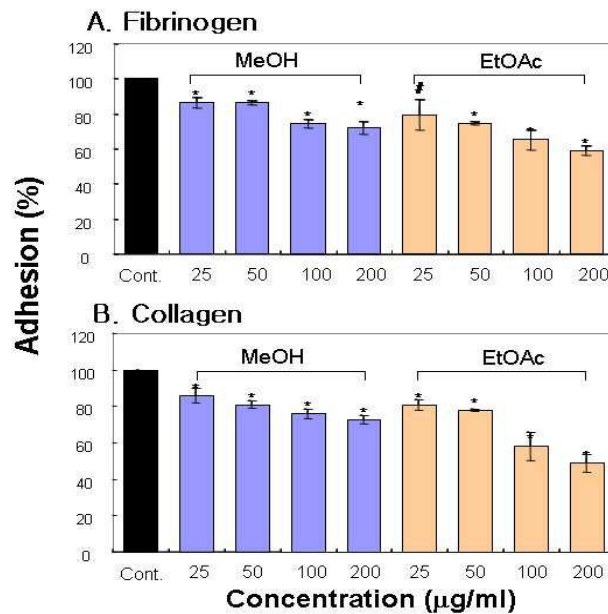
<113> 아울러 본 발명은 항산화 효능을 갖는 약학 조성물을 제공하였다.

도면의 간단한 설명

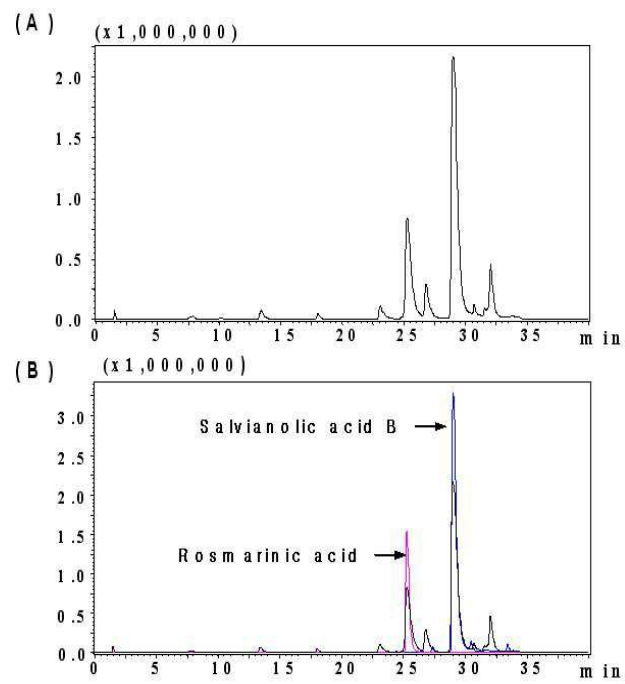
- <1> 도 1은 본 발명의 실시예 1 및 실시예 4의 사용 농도에 따른 피브리노겐과 콜라겐에 대한 혈소판 부착 억제 효율을 비교예 1과 비교하여 나타낸 그래프,
- <2> 도 2(A)는 본 발명의 실시예 4에 대한 HPLC 결과를 나타낸 그래프,
- <3> 도 2(B)는 로즈마린산과 살비아놀산 B의 HPLC 결과를 나타낸 그래프,
- <4> 도 3은 본 발명의 실시예 4에서 검출된 로즈마린산과 살비아놀산 B 및 기준 물질인 로즈마린산과 살비아놀산 B의 UV-Visible 흡광도를 나타낸 그래프,
- <5> 도 4는 본 발명의 실시예 4에서 검출된 로즈마린산과 살비아놀산 B 및 기준 물질인 로즈마린산과 살비아놀산 B의 형광스펙트럼 결과를 나타낸 그래프,
- <6> 도 5는 로즈마린산과 살비아놀산 B의 응집 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도면

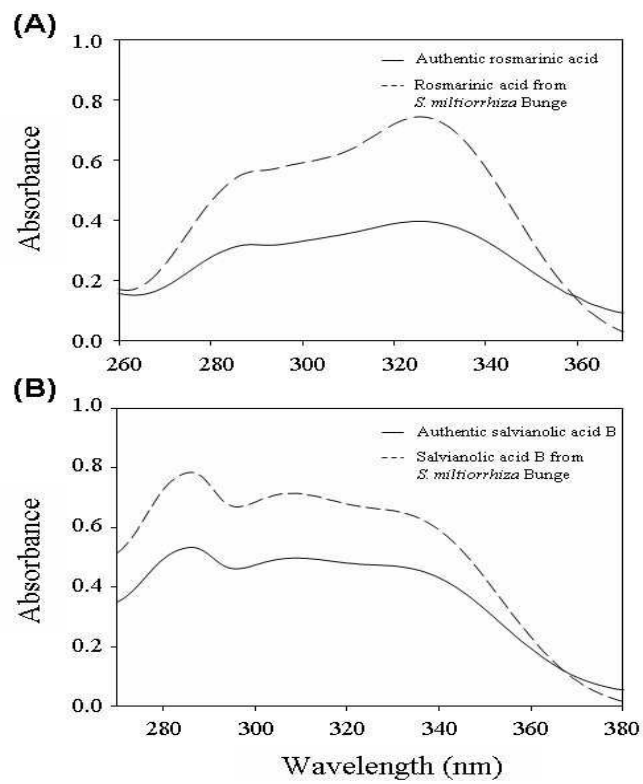
도면1



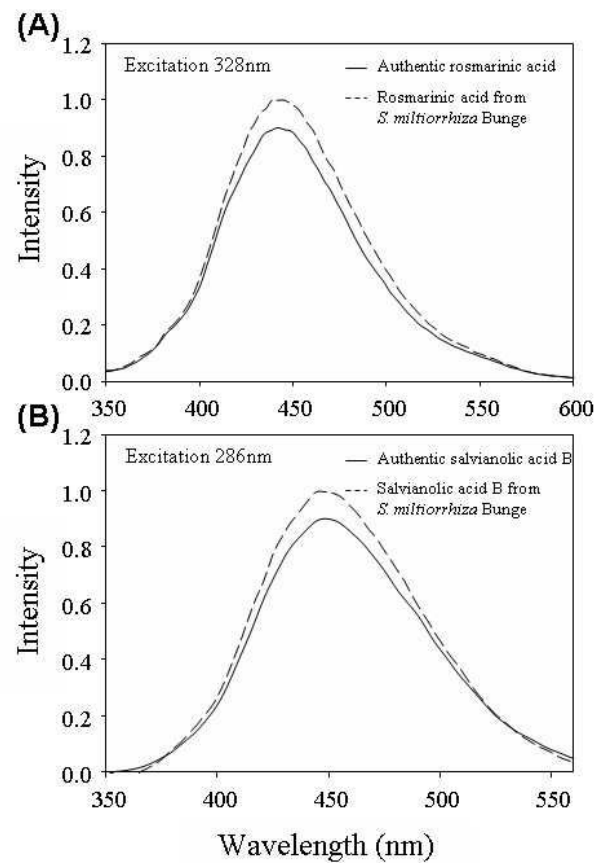
도면2



도면3



도면4



도면5

