



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0081492
(43) 공개일자 2017년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/09 (2006.01)
A23L 27/20 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 27/20 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0000589
(22) 출원일자 2016년01월04일
심사청구일자 2016년01월04일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
조현정
대전광역시 중구 계룡로 922 남광하우스토리2차
202동 1203호
노주예
대전광역시 서구 관저북로 80 원앙마을2단지아파트
202동 1501호
류진협
대전광역시 중구 계룡로 922 남광하우스토리2차
202동 1203호
(74) 대리인
김대영

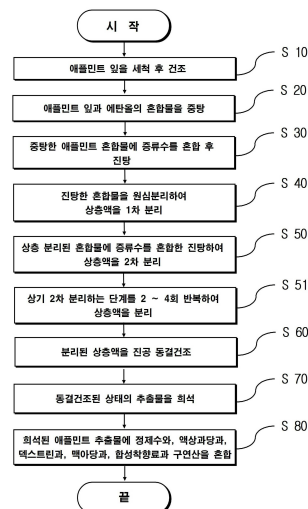
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 천연재료인 애플민트로부터 세포독성이 없으면서 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 얻을 수 있는 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 29/30 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2300/10 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-B-0014-010101

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학공동기술개발지원사업

연구과제명 천연물을 이용한 혈행개선제 및 항혈소판제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 건양대학교산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

애플민트 잎을 세척 후 건조하는 단계(S 10);

상기 애플민트 잎과 에탄올을 1 : 19 ~ 21 중량비로 혼합한 혼합물을 4 ~ 6시간 중탕하는 단계(S 20);

중탕한 애플민트 혼합물에 상기 애플민트 잎 대비 증류수를 1 : 9 ~ 11 중량비로 혼합한 후 5 ~ 15분간 진탕하는 단계(S 30);

진탕한 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 단계(S 40);

상층 분리된 혼합물에 상기 애플민트 잎 대비 증류수를 1 : 9 ~ 11 중량비로 혼합한 후 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 단계(S 50);

분리된 상층액을 진공 동결건조하는 단계(S 60); 로 이루어지는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 2차 분리하는 단계를 2 ~ 4회 반복하여 상층액을 분리하는 단계(S 51)와,

동결건조된 상태의 추출물에 물을 첨가하여 1 ~ 25%(w/v) 농도로 희석하는 단계(S 70); 를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

희석된 애플민트 추출물 100 중량부에 대하여 정제수 23.9 ~ 43.9 중량부와, 액상과당 20 ~ 28 중량부와, 텍스트린 20 ~ 28 중량부와, 맥아당 16 ~ 20 중량부와, 합성착향료 0.05 내지 0.15 중량부를 혼합하는 단계(S 80)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 1차 분리하는 단계에서 1800×g로 원심분리하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 동결건조하는 단계에서 상기 진공 동결건조는 -75 ~ -65℃의 온도 조건에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 항혈전 효과를 갖는 천연재료 추출물의 제조방법에 관한 것으로, 자세하게는 애플민트로부터 세포독성이 없으면서 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 얻을 수 있는 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 식생활이 서구화와 운동량 저하 등의 이유로 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화, 심혈관 질환이 증가하고 있는 가운데 이러한 질환은 주요 원인으로 원활한 혈류를 방해하는 혈전이 지목되고 있다.

[0003] 이러한 혈전은 피브리노겐이 트롬빈에 의해 피브린으로 전환되어 형성되는 중합체로서, 뇌혈관이나 심장혈관에서 혈전이 형성되는 경우 상당히 치명적인 상황이 유발되므로 발명시 신속한 혈관조영술이나 혈전용해 등의 조치가 필요하다.

[0004] 현재 이와 같은 혈전을 예방하고 치료하기 위한 많은 약물이 개발되었으나 혈관 손상 부위에서의 출혈 시간의 연장과 위장 점막에서의 내출혈 또는 전신성 출혈 등의 부작용으로 인하여 장기 치료에 적합하지 못하다.

[0005] 따라서 안전하고 효과적인 항혈소판제의 개발을 위한 많은 연구가 이루어지고 있는 가운데, 특히 여러 가지 부작용이 일어날 수 있는 인공적인 의약품과 달리 유효 성분이 미량이거나 그 활성이 매우 적더라도 반복해서 장기간 섭취함으로써 지속적인 영향을 줄 수 있는 자연식품으로부터 그 성분을 찾는 것이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2001-0009590호 (2001.02.05 공개.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 창출된 것으로, 본 발명의 목적은 천연재료인 애플민트를 활용하여 세포독성이 없으면서 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 얻을 수 있는 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 목적을 위해 본 발명은 애플민트 잎을 세척 후 건조하는 단계; 상기 애플민트 잎과 에탄올을 1 : 19 ~ 21 중량비로 혼합한 혼합물을 4 ~ 6시간 중탕하는 단계; 중탕한 애플민트 혼합물에 상기 애플민트 잎 대비 증류수를 1 : 9 ~ 11 중량비로 혼합한 후 5 ~ 15분간 진탕하는 단계; 진탕한 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 단계; 상층 분리된 혼합물에 상기 애플민트 잎 대비 증류수를 1 : 9 ~ 11 중량비로 혼합한 후 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 단계; 분리된 상층액을 진공 동결건조하는 단계;로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0009] 이때 상기 2차 분리하는 단계를 2 ~ 4회 반복하여 상층액을 분리하는 단계(S 51)와, 동결건조된 상태의 추출물에 물을 첨가하여 1 ~ 25%(w/v) 농도로 희석하는 단계(S 70);를 더 포함할 수 있다.

[0010] 또한, 희석된 애플민트 추출물 100 중량부에 대하여 정제수 23.9 ~ 43.9 중량부와, 액상과당 20 ~ 28 중량부와, 텍스트린 20 ~ 28 중량부와, 맥아당 16 ~ 20 중량부와, 합성착향료 0.05 내지 0.15 중량부를 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0011] 또한, 상기 1차 분리하는 단계에서 1800×g로 원심분리하는 것이 바람직하다.

[0012] 또한, 상기 동결건조하는 단계에서 상기 진공 동결건조는 -75 ~ -65℃의 온도 조건에서 이루어지는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0013] 본 발명을 통해 애플민트로부터 세포독성 없으면서 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 생성할 수 있는 효과가 있으며, 이를 다양한 첨가물과 혼합하여 식감과 풍미를 증진시켜 일반인들이 거부감 없이 섭취가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명에 따른 애플민트 추출물의 제조방법을 도시한 순서도,
 도 2는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 애플민트 추출물의 효과를 나타낸 그래프,
 도 3은 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 애플민트 추출물의 TXA₂ 생성 억제 효과를 나타낸 그래프,
 도 4는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 애플민트 추출물의 [Ca²⁺]_i 억제 효과를 나타낸 그래프,
 도 5는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 애플민트 추출물의 cAMP 상승 효과 및 cGMP 비상승 효과를 각각 나타낸 그래프,
 도 6은 Rat plasma에서 애플민트 추출물의 PT, aPTT에 미치는 영향을 각각 나타낸 그래프,
 도 7은 혈소판에서 애플민트 추출물의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 항혈전 효과를 갖는 애플민트 추출물의 제조방법을 구체적으로 설명한다.

[0016] 도 1은 본 발명에 따른 애플민트 추출물의 제조방법을 도시한 순서도로서, 본 발명은 애플민트 추출물의 제조를 위한 바람직한 방법으로 여덟 가지 주요 단계로 구분하게 된다.

[0017] 첫 번째 단계(S10)는 애플민트 잎을 세척 후 건조하는 단계(S 10)로서, 전남 화순군에서 구입한 애플민트 잎을 흐르는 물에 2회 세척한 후 완전히 건조하였다.

[0018] 두 번째 단계(S 20)는 상기 애플민트 잎과 에탄올을 1 : 19 ~ 21 중량비로 혼합한 혼합물을 4 ~ 6시간 중탕하는 단계로서, 이때 사용되는 에탄올은 70% 수용액인 것을 사용한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 첫 번째 단계(S 10)를 통해 세척 건조된 애플민트 잎 10g에 70% Ethanol 200ml을 혼합 후 약불에 5시간 동안 중탕하였다.

[0019] 세 번째 단계(S 30)는 중탕한 애플민트 혼합물에 상기 애플민트 잎 대비 증류수를 1 : 9 ~ 11 중량비로 혼합한 후 5 ~ 15분간 진탕하는 단계이다. 여기서 진탕(shaking)이란 시료로부터 분석성분을 추출하기 위하여 일정한 속도로 흔들리게 하는 것을 의미하며, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 두 번째 단계(S 20)를 통해 중탕된 혼합물에 100ml의 증류수를 넣은 뒤 10분간 진탕하였다.

[0020] 네 번째 단계(S 40)는 세 번째 단계(S 30)를 통해 진탕한 혼합물을 8 ~ 12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 단계이다.

[0021] 다섯 번째 단계(S 50)는 네 번째 단계(S 40)를 통해 상층 분리된 혼합물에 상기 애플민트 잎 대비 증류수를 1 : 9 ~ 11 중량비로 혼합한 후 8 ~ 12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 단계이다.

[0022] 바람직하게는 상기 2차 분리하는 단계(S 50)를 2 ~ 4회 반복하여 상층액을 분리하는 단계(S 51)를 더 포함하게 되며, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 1차 분리 단계(S 40)에서 원심분리기를 사용하여 1800 x g 에서 10분간 원심 분리하여 상층을 분리하고 증류수를 100 를 첨가한 뒤 재 진탕, 원심분리를 총 5회 반복하였다. 이때, 상층액 분리작업이 총 6회를 초과하면 희석이 과도하게 되어 효과를 발휘하기 어렵고 오히려 이전에 분리된 상층액을 희석시키기 때문에 바람직하지 않다.

[0023] 이후 여섯 번째 단계(S 60)에서는 분리된 상층액을 -75 ~ -65℃의 온도 조건에서 진공 동결건조하는 단계로서, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 Freeze dryer (Ilshin BioBase)를 이용하여 - 70 ℃에서 진공 동결 건조하였다.

[0024] 이후, 동결건조된 상태의 추출물을 물을 첨가하여 1 ~ 25%(w/v) 농도로 희석하는 단계(S 70)를 더 포함할 수 있

다.

- [0025] 이와 같은 과정을 통해 생성되는 애플민트 추출물(Apple mint extract, 이하 APE))의 수득률은 $35.8 \pm 5.2\%$ 정도이다.
- [0026] 이와 같이 제조된 애플민트 추출물을 일반인들이 섭취하기에 유용하도록 제품화함에 있어, 희석된 애플민트 추출물 100 중량부에 대하여 정제수 23.9 ~ 43.9 중량부와, 액상과당 20 ~ 28 중량부와, 텍스트린 20 ~ 28 중량부와, 맥아당 16 ~ 20 중량부와, 합성착향료 0.05 내지 0.15 중량부 및 소량의 구연산을 혼합하는 단계(S 80)를 더 포함할 수 있다.
- [0027] 이와 같은 첨가물의 혼합을 통해 제품의 섭취시 식감과 풍미를 증진시켜 다양한 연령대의 이용자들이 거부감 없이 먹도록 하는데 큰 도움을 줄 수 있으며, 이를 지속적으로 복용함으로써 혈전을 예방하고 개선할 수 있게 된다.
- [0029] 다음으로, 본 발명에 따른 APE에 대한 효과를 검증하기 위한 실험방법과 결과를 설명한다.
- [0030] A. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 APE의 효과
- [0031] (1) 실험방법
- [0032] 1) Washed rat platelet 제조
- [0033] 코아텍(대한민국, 평택)에서 구입한 SD Rat(8 week-old, male)의 전혈을 분리하여 $180 \times g$, $25^{\circ}C$ 에서 10분 동안 원심분리하고 적혈구를 침전시켜 순수한 PRP(Platelet-Rich Plasma)를 얻었다. 이것을 다시 $1800 \times g$, $25^{\circ}C$ 에서 10분 동안 원심분리하여 PPP(Platelet-Poor Plasma)와 혈소판(PLTs)으로 분리하였다.
- [0034] 분리된 혈소판은 Washing buffer(128 mM NaCl , 2.7 mM KCl , $0.36 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 12 mM NaHCO_3 , 5.5 mM Glucose , 1 mM EDTA , pH 6.9)를 이용하여 washing하고 $1800 \times g$, $25^{\circ}C$ 에서 10분 동안 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. Washing buffer에서 분리된 혈소판을 suspending buffer(128 mM NaCl , 2.7 mM KCl , $0.36 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 12 mM NaHCO_3 , 5.5 mM Glucose , 0.49 mM MgCl_2 , pH 7.4) 적당량을 PLTs에 조심스럽게 첨가하여 pipette으로 cell suspension을 실시하였다. Cell counting을 하기 위해서 이 중 일부를 취하여 여분의 suspending buffer로 20 배 희석한 후, UV/visible spectrophotometer를 이용하여 660nm 에서 흡광도를 측정하였다. 660nm 에서 흡광도값이 1.1일 때 1×10^8 개의 PLTs를 의미하므로, 원하는 cell 수, 5×10^8 Platelets/ mL 가 되도록 suspending buffer를 첨가하여 조정하였다.
- [0035] 2) 혈소판 응집반응 관찰
- [0036] 모든 Platelets aggregation은 AGGREGOMETER(Chrono-Log Co.)를 이용하여 $37^{\circ}C$ 에서 light transmission의 변화를 측정하였다. In vitro에서 반응계를 $250\mu\text{L}$ 로 하여 washed PLTs에 CaCl_2 2mM 를 첨가하여 3분간 preincubation 하고, collagen($2\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 측정할 것을 controls로 하였다. 그리고 같은 조건에, 검토하고자 하는 시료(APE)를 함께 첨가한 후 collagen($2\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 측정하여 시료의 영향을 알아보았다.
- [0037] (2) 실험결과
- [0038] 도 2는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 애플민트 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0039] APE에 의한 혈소판 응집 억제효과를 측정하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, Collagen($2\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 응집을 유도하였을 때, 응집률은 $67.0 \pm 2.4\%$ 로 증가하였으나 APE를 다양한 농도로 처리하였을 때(50 , 100 , $200\mu\text{g}/\text{mL}$), 유의성을 가지고 농도 의존적으로 혈소판 응집이 감소되었으며(각각 57.0 ± 8.2 , 41.3 ± 8.6 , $25.0 \pm 6.7 \%$), 억제율이 농도 의존적으로 증가하였다. 따라서 APE가 혈소판 응집 억제 효과를 가짐을 알 수 있다.
- [0041] B. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 APE의 TXA_2 생성 억제 효과
- [0042] (1) 실험방법
- [0043] APE의 TXB_2 생성 억제능을 측정하기 위하여 "A"에서 기술한 방식으로 8분간 혈소판 응집반응을 시행한 후, ice-

cold EDTA(5mM) and indomethacin (0.2mM)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. TXA₂의 안정한 상태인 TXB₂의 양을 TXB₂ EIA kit(Cayman Chemical)를 이용하여 측정하였으며 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참조하였다.

(2) 실험결과

도 3은 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 애플민트 추출물의 TXA₂ 생성 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

TXA₂는 혈소판에서 강력한 혈소판 응집 요소로 작용한다. APE가 TXB₂의 생성에 관여하는지 알아보기로 TXB₂ 생성을 측정하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, Collagen으로 응집을 유도하였을 때, TXB₂의 양이 1.2 ± 0.1 에서 $43.0 \pm 7.7 \text{ ng}/10^8 \text{ platelets}$ 로 증가하였으나 APE를 농도별로 처리하였을 때 (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 유의성을 가지고 농도 의존적으로 TXB₂ 생성이 억제되었다 (42.1 ± 5.4 , 36.5 ± 2.6 , $28.6 \pm 6.2 \text{ ng}/10^8 \text{ platelets}$). 따라서 APE는 TXA₂를 억제하여 항혈소판 효과를 갖는다.

C. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 APE의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 억제 효과

(1) 실험방법

Concentrated PRP를 만드는 과정 가운데 washing buffer와 혈소판(PLTs)으로 분리되면 상층의 washing buffer를 조심스럽게 덜어낸 후 PLTs에 다시 suspending buffer 10ml를 첨가했다. 여기에 1mM의 Fura 2/AM을 50 μl 를 넣어서 final 농도가 5 μM 이 되도록 첨가했다. 이것을 부드럽게 inversion 한 후 37°C에서 60분간 incubation하고, incubation이 끝나면 $1800 \times g$, 25°C에서 10분 동안 원심분리시켜 상층의 suspending buffer 층과 Fura 2/AM이 loading된 PLTs층으로 분리했다. 하층의 PLTs suspending buffer를 첨가하여 2회 세척 후, suspending buffer를 첨가하여 cell suspension 하였고 cell counting 하여 5×10^8 Fura 2/AM loaded platelets/ml로 조정하였다. 빛을 차단하기 위해 aluminum foil로 wrapping 하여 위의과정을 수행하였다. Fura 2/AM이 loading된 혈소판을 이용하여 fluorescence의 변화를 RF-5301 PC spectrofluorophotometer (shimadzu)를 이용하여 측정하였다. Excitation 340nm, emission 510nm로 setting 하여 37°C에서 8분간 time drive를 시행하였는데 3분 되는 지점에 collagen(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여 세포질 내 Ca^{2+} 의 양을 측정하였다. 실제 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 은 relative fluorescence(rf)로 나타나기 때문에 $F_{\max}$ 와 $F_{\min}$ 을 각각 측정한 후 이들 값과 Fura 2/AM의 분해정수($K_d=224\text{nM}$)를 아래의 [수학식 1]에 대입하여 혈소판 내부의 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 계산하였다.

[수학식 1]

$$[\text{Ca}^{2+}]_c = K_d \times (F_o - F_{\min}) / (F_{\max} - F_o)$$

F_o 는 자극 전의 fluorescence이다. 또 $F_{\min}$ 는 최소 fluorescence로서, CaCl_2 를 첨가하지 않은 상태에서 10% triton X-100과 2M tris-300mM EGTA를 첨가하여 측정하였고, $F_{\max}$ 는 최대 fluorescence로서, 충분한 CaCl_2 가 존재하는 상태에서 10% triton X-100을 첨가하여 측정하였다.

(2) 실험결과

도 4는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 애플민트 추출물의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

칼슘은 강력한 혈소판 응집 촉진 물질로 작용한다. 따라서 APE가 세포질내 칼슘동원($[\text{Ca}^{2+}]_i$)에 미치는 영향을 측정하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 안정한 상태의 혈소판에서 Collagen으로 응집을 유도하였을 때 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 이 336.0 ± 40.1 에서 $3114.4 \pm 331.7 \text{ nM}$ 로 증가하였으며, APE를 농도별로 처리하였을 때(50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 유의성을 가지고 농도 의존적으로 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 이 억제되었다(각각 2263.3 ± 567.3 , 848.4 ± 79.5 , $657.4 \pm 108.5 \text{ nM}$). 따라서 APE는 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 을 억제하여 항혈소판 효과를 나타낸다.

- [0058] D. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 APE의 cAMP 상승 효과
- [0059] (1) 실험방법
- [0060] cAMP와 cGMP를 측정하기 위하여 "A"에서 기술한 방식으로 혈소판 응집반응을 유도한 뒤, 8분이 되는 시점에서 80% ice-cold ethanol을 첨가하여 반응을 정지시켰으며, cAMP와 cGMP값은 각각 cAMP와 cGMP EIA kits (BioVision)을 이용하여 측정하였으며 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참고하였다
- [0061] (2) 실험결과
- [0062] 도 5(A)는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 애플민트 추출물의 cAMP 상승 효과를 나타낸 그래프, 도 5(B)는 cGMP 비상승 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0063] Cyclic adenosine monophosphate(cAMP)와 Cyclic guanosine monophosphate(cGMP)는 혈소판 응집 억제하는 second messenger로 작용한다. ATP와 GTP가 각각 cAMP와 cGMP로 전환되어, 각각에 의존적인 Kinase activity가 상승되어 특정 단백질이 phosphorylation되면서 항혈소판 효과를 갖는 것으로 알려져있다.
- [0064] 따라서 cAMP 또는 cGMP에 있어서 APE의 효과를 측정하였다. 도 5(A)와 5(B)가 같이 Collagen으로 유도된 혈소판에서 안정된 상태의 cAMP (23.7 ± 3.7 pmol/ 10^8 platelets)와 비교하여 감소하였다가 (21.1 ± 3.7 pmol/ 10^8 platelets), APE를 농도별로 처리하였을 때 (50, 100, 200 μ g/ml) cAMP 농도가 유의성을 가지고 농도 의존적으로 상승되었다(각각 24.9 ± 1.4 , 31.9 ± 2.7 , 37.9 ± 1.2 pmol/ 10^8 platelets). 그러나, 도 5(B)와 같이 APE는 cGMP를 상승시키지 않았다. 이러한 결과는 APE가 cGMP가 아닌 cAMP를 상승시켜 항혈소판 효과를 나타냄을 의미한다.
- [0066] E. Rat plasma에서 APE의 PT, aPTT에 미치는 영향
- [0067] (1) 실험방법
- [0068] APE가 coagulation에 미치는 영향을 측정하고자 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(aPTT)을 측정하였다. Sod. Citrate가 처리된 rat의 혈장을 이용하여 $1,800 \times g$ 에 10분간 원심분리한 plasma를 이용하여 PT와 aPTT를 coagulation analyzer (TS 4000, MD pacific)로 측정하였다. PT 시험을 위해 plasma를 2분간 37°C에서 배양한 후, PT reagent(Thermo Scientific Co.)를 첨가하여 clot이 형성되는 시간을 측정하였으며, aPTT 시험을 위해 plasma를 aPTT reagent(Thermo Scientific Co.)를 처리하여 3분간 37°C에서 배양하고 0.02M $CaCl_2$ (Thermo Scientific Co.)를 첨가하여 clot이 형성되는 시간을 측정하였다.
- [0069] (2) 실험결과
- [0070] 도 6(A)은 Rat plasma에서 애플민트 추출물의 PT에 미치는 영향을 나타낸 그래프, 도 6(B)은 Rat plasma에서 애플민트 추출물의 aPTT에 미치는 영향을 각각 나타낸 그래프이다.
- [0071] APE는 PT와 aPTT에서 응고 시간을 연장시키지 않았다. 이는 APE가 2차 지혈에 영향이 없음을 의미한다. 그러나 항혈소판제의 대표적인 부작용 중의 하나가 출혈인 점을 토대로 하여, APE는 출혈 부작용이 없음을 제시하는 바이다. 이로써 Aspirin 등의 기존 항혈소판제가 갖는 출혈 부작용을 해결하는 안전한 천연물 신약으로서의 의미를 가짐을 확인할 수 있다.
- [0073] F. APE가 세포독성에 미치는 영향
- [0074] (1) 실험방법
- [0075] APE가 세포에 미치는 영향을 측정하기 위하여 108 cells/ml의 혈소판에 APE를 농도별로 처리한 뒤, 8분간 incubation 하였다. 이후 Cell Viability Assay Kit (대일 랩 서비스)를 이용하여 APE에 노출된 후 살아있는 세포의 양을 450nm로 측정하여 Cell Viability를 확인하였다.
- [0076] (2) 실험결과

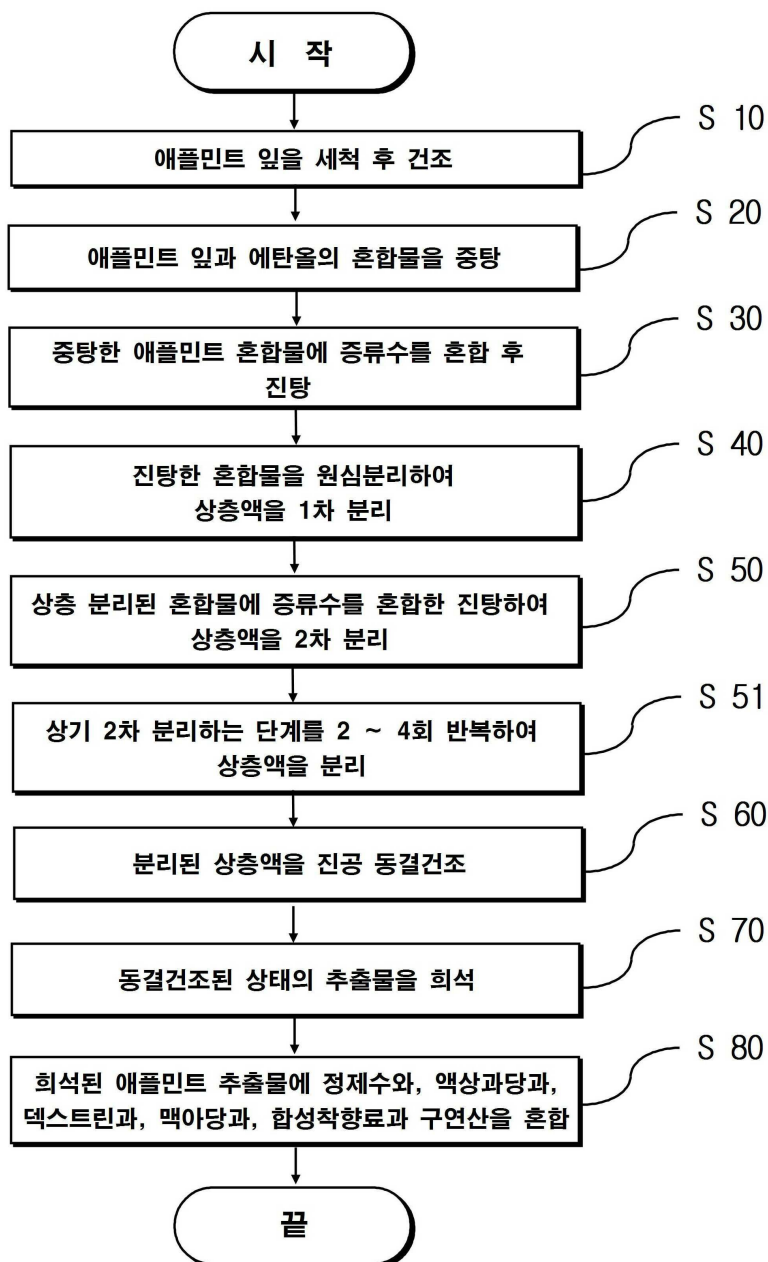
[0077] 도 7은 혈소판에서 애플민트 추출물의 세포 독성을 나타낸 그래프이다.

[0078] APE가 혈소판에 미치는 세포독성 여부를 알아보기 위해 cell viability를 측정하였다. APE를 농도별로 처리하였을 때 Control 대비 세포 사멸에 영향을 미치지 않다. 이러한 결과로, APE가 본 실험에서 사용된 최대 농도인 200 μ g/ml 안에서 세포 독성 없이 항혈소판 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 APE는 천연물 유래의 효능이 우수한 안전한 항혈소판제라고 할 수 있다.

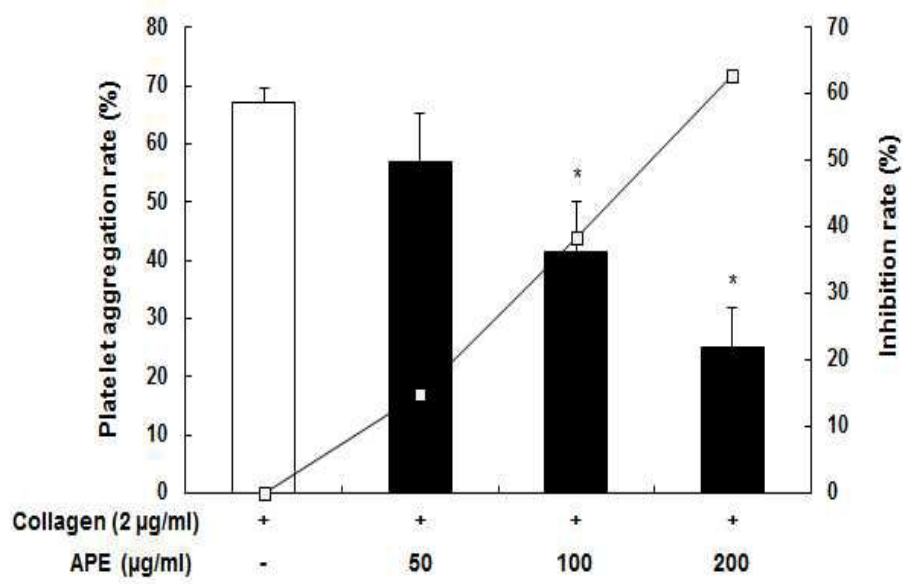
[0079] 본 발명의 권리는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

도면

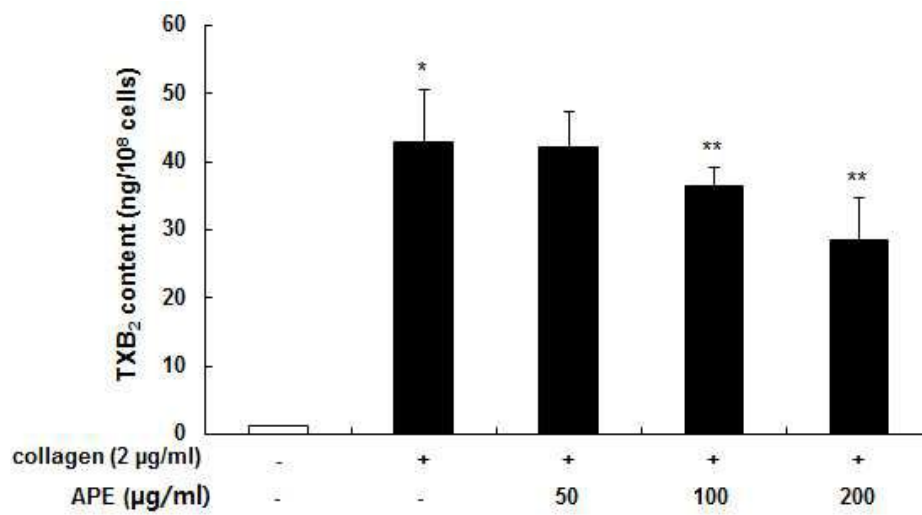
도면1



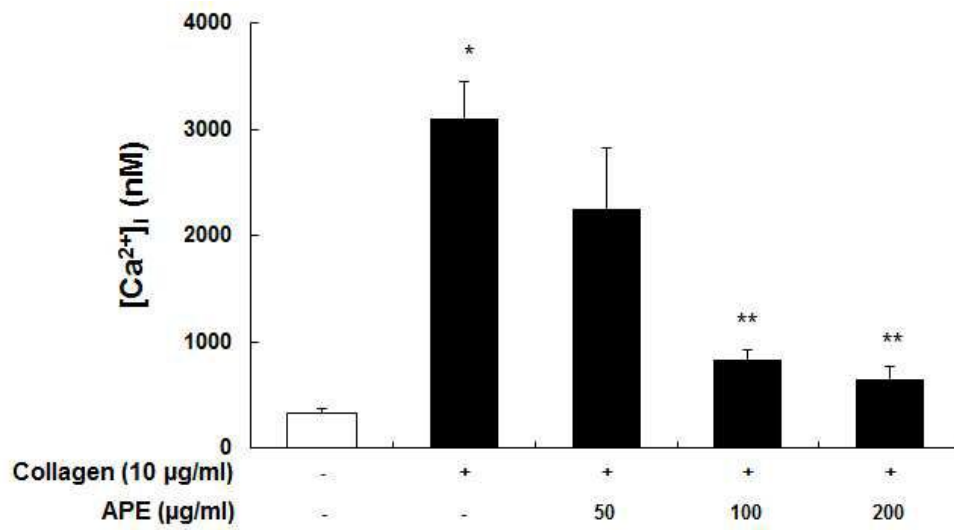
도면2



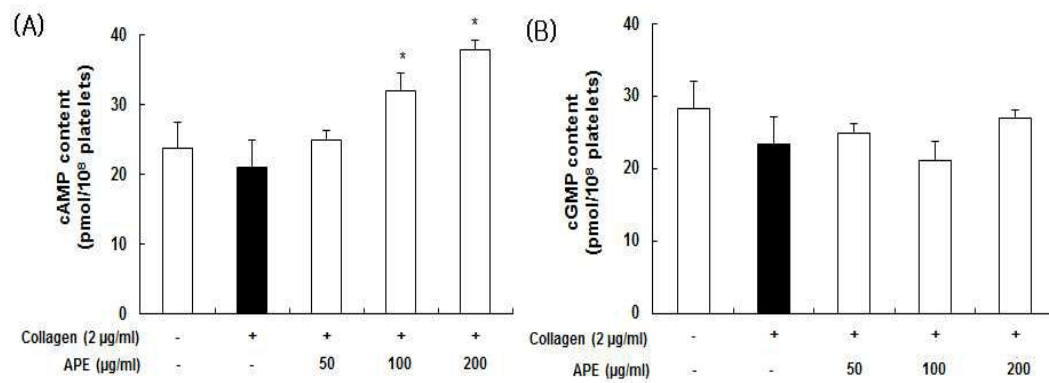
도면3



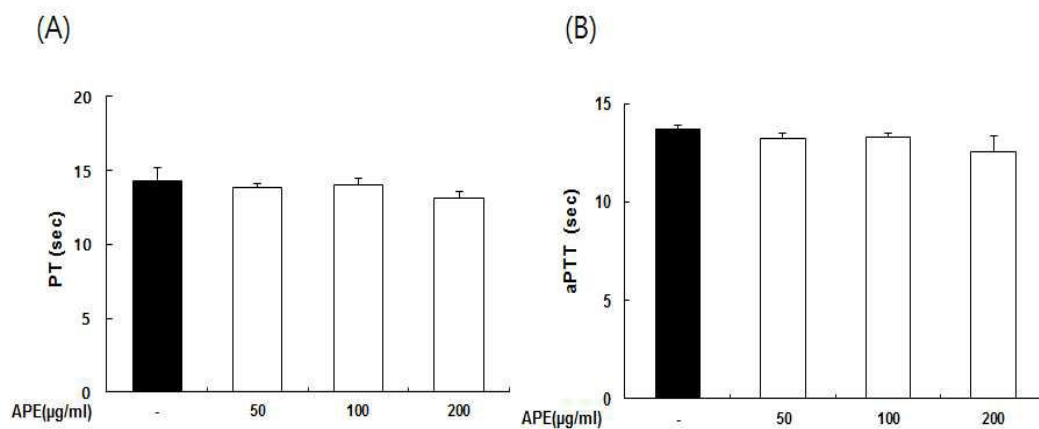
도면4



도면5



도면6



도면7

