



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0077808
(43) 공개일자 2012년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/73 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0139894

(22) 출원일자 2010년12월31일

심사청구일자 2010년12월31일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

육홍선

대전광역시 서구 둔산남로 127, 305동 307호 (둔산동, 목련아파트)

신현진

대전광역시 서구 대덕대로 415, 108동 603호 (만년동, 상아아파트)

김경희

대전광역시 대덕구 한밭대로1033번길 15, 7동 507호 (오정동, 신동아아파트)

(74) 대리인

최규환

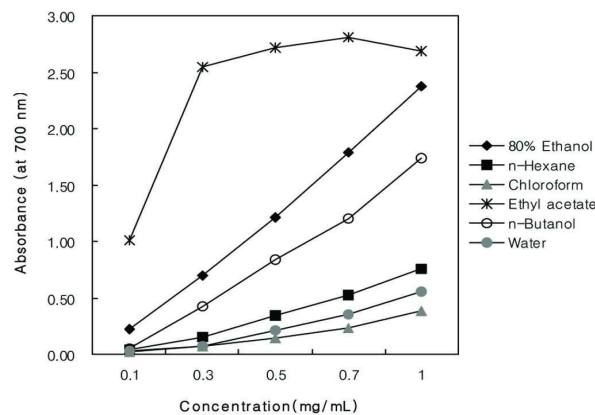
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 항바이러스, 항산화 및 항균 효과를 가지는 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물

(57) 요약

본 발명은 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용, 항산화용 또는 항균용 조성물 및 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스, 항산화 또는 항균 활성 증가용 식품에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

눈개승마(*Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* Hara) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용 조성물.

청구항 2

눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항산화용 조성물.

청구항 3

눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항균용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 눈개승마 추출물은 눈개승마 에탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 눈개승마 에탄올 추출물은

(a) 건조된 눈개승마 160~240 중량부에 70~90% 에탄올을 2400~3600 중량부를 가하여 20~28시간 동안 2~4회 추출하는 단계; 및

(b) 상기 추출된 추출액을 여과한 후 30~50℃에서 감압 및 농축한 후 동결건조하는 단계에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분획물은 n-헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 n-부탄올(n-butanol)을 순차적으로 가하여 얻어진 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 포유류 질병을 야기하는 바이러스인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스 A(influenza virus A), PEDV(Porcine epidemic diarrhoea coronavirus), BRV(bovine rotavirus) 또는 PRV(Pseudorabies virus)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 항균 효과는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 억제하는 효과인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제1항의 조성물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스 활성 증가용 식품.

청구항 11

제2항의 조성물을 유효성분으로 함유하는 항산화 활성 증가용 식품.

청구항 12

제3항의 조성물을 유효성분으로 함유하는 항균 활성 증가용 식품.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용, 항산화용 또는 항균용 조성물 및 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스, 항산화 또는 항균 활성 증가용 식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라에 자생하는 식물 3,200여 종 중에 480여 종이 식용으로 이용할 수 있다고 알려져 있다. 식용가능한 식물은 넓은 의미에서 산채라고 하는데, 실제로 사람이 먹을 수 있는 식물 중 기호성이 좋고 식품적 가치가 높은 식물을 산채로 이용하고 있다. 산채는 예로부터 구황식물로서 우리 조상들이 식량부족으로 어려움을 겪을 때 주로 이용하여 왔으며, 비타민, 미네랄, 엽록소를 비롯한 영양소 및 식물 섬유소가 풍부하게 함유되어 있고 특히 산채 고유의 향과 맛으로 식용으로 가치가 높다. 현재 100여 종의 산채가 알려져 있고, 산채에는 각종 알칼로이드, 탄닌, 사포닌, 배당체, 플라보노이드류가 많이 함유되어 있기 때문에 특수한 생리학적 기능을 나타낼 가능성이 매우 높은 것으로 지적되고 있다. 국내에서도 자생하는 식용식물의 식품적 가치가 재인식되어 수요가 매년 증가하고 있으며, 식품, 한약 및 민간약 등으로부터 생리활성 물질을 탐구하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근에는 영양 불균형에서 오는 만성 퇴행성 질환 등을 예방하고, 항비만 효과, 중금속 해독효과, 항돌연변이능, 항암 및 항산화 효과, 항균효과 및 유전독성억제능이 높은 것으로 밝혀져 다양한 산채류의 생리적 기능에 관한 연구 및 개발의 필요성이 강조되고 있다.

[0003] 우리나라 고산 수림지대에 자생하는 눈개승마(*Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* Hara)는 장미과의 다년생 식물이다. 눈개승마는 울릉도에서 삼나무로 불리며 그 외에 죽토자(goat's beard) 등으로 불리고 있다. 눈개승마는 어린순이 20 cm 정도 자랐거나 복토 위로 싹이 보일 때 수확하여 끓는 물로 데친 후 말리고 비늘형 껍질과 작은 잎을 제거한 후 식용으로 이용한다. 주성분은 사포닌이 들어 있어 성인병에 탁월한 효능을 지니며, 진초는 해독, 편도선염에 효과가 있어 약용으로 쓰이며 어린순은 탄수화물과 무기물 함량이 풍부하다. 울릉도에서는 눈개승마가 해독 및 정력보강 효과가 있는 것으로 알려져 예로부터 명절에 쇠고깃국을 끓일 때 눈개승마를 넣어서 이용하고 있다. 국내의 눈개승마에 관한 연구는 염소가 야생 눈개승마를 장기간 섭취하였을 때 체중이 감소하는 연구와 눈개승마 에탄올 추출물이 스트렙토조토신(streptozotocin)으로 유발한 쥐의 당뇨를 경감시킨다는 등의 보고를 제외하고는 거의 전무한 실정이다.

[0004] 한국특허등록 제0665504호에는 눈개승마 추출물을 포함하는 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료를 위한 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 항바이러스, 항산화 및 항균 효과를 가지는 눈개승마 추출물 또는 눈개승마 분획물과는 상이하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 눈개승마를 에탄올을 이용하여 추출한 추출물 및 이의 분획물이 항산화, 항균 및 항바이러스 효과를 나타냄으로써, 이를 통하여 상기 눈개승마의 다양한 유용성을 밝히는 데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항산화용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 항바이러스용 조성물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스 활성 증가용 식품을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 항산화용 조성물을 유효성분으로 함유하는 항산화 활성 증가용 식품을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 항균용 조성물을 유효성분으로 함유하는 항균 활성 증가용 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용, 항산화용 및 항균용 조성물은 식물로부터 얻어진 물질을 함유하기 때문에 부작용을 일으키지 않고 건강 지향의 기능성 식품을 제공하여, 식품류 및 차 등에 기능성 식품으로 유용하게 쓰일 수 있으며, 이를 통해 농가의 생산력 향상 및 부가가치 증대를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 눈개승마 추출물 및 이의 분획물을 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 및 1.0 mg/mL의 농도로 각각 달리하여 첨가한 후 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정한 것이다.

도 2는 눈개승마 추출물 및 이의 분획물을 0.1, 0.5, 1 및 5 mg/mL의 농도로 각각 희석하여 티로시나아제(tyrosinase) 저해활성을 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항산화용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 눈개승마 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 눈개승마 추출물은 눈개승마 에탄올 추출물일 수 있는데, 상기 눈개승마 에탄올 추출물은

[0018] (a) 건조된 눈개승마 160~240 중량부에 70~90% 에탄올을 2400~3600 중량부를 가하여 20~28시간 동안 2~4회 추출하는 단계; 및

[0019] (b) 상기 추출된 추출액을 여과한 후 30~50℃에서 감압 및 농축한 후 동결건조하는 단계에 의해 제조될 수 있으며,

[0020] 바람직하게는

[0021] (a) 건조된 눈개승마 200 중량부에 80% 에탄올을 3000 중량부를 가하여 24시간 동안 3회 추출하는 단계; 및

[0022] (b) 상기 추출된 추출액을 여과한 후 40℃에서 감압 및 농축한 후 동결건조하는 단계에 의해 제조될 수 있다.

[0023] 또한, 상기 분획물은 n-헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 n-부탄올(n-butanol)을 순차적으로 가하여 얻어진 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 항바이러스용 조성물에서, 상기 바이러스는 바람직하게는 포유류 질병을 야기하는 바이러스이며, 더욱 바람직하게는 인플루엔자 바이러스 A(influenza virus A), PEDV(Porcine epidemic diarrhoea coronavirus), BRV(bovine rotavirus) 또는 PRV(Pseudorabies virus)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 또한, 항균용 조성물에서 항균 효과는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 억제하는 효과인 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명은 또한, 상기 항바이러스용 조성물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스 활성 증가용 식품을 제공한다.

[0027] 본 발명은 또한, 상기 항산화용 조성물을 유효성분으로 함유하는 항산화 활성 증가용 식품을 제공한다.

[0028] 본 발명은 또한, 상기 항균용 조성물을 유효성분으로 함유하는 항균 활성 증가용 식품을 제공한다.

[0029] 상기 식품은 항산화, 항균 또는 항바이러스 활성을 증가시키기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.

- [0030] 본 발명의 상기 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0031] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 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 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0032] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01~0.04 g, 바람직하게는 약 0.02~0.03 g이다.
- [0033] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0034] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] **1. 실험재료**
- [0036] 실험에 사용된 눈개승마(*Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* Hara)는 2009년 6월에 강원도농업기술원 특화작물시험장으로부터 제공받아, 일주일 동안 음건하고 마쇄하여 분말로 만든 후 실험에 사용하였다.
- [0037] **2. 눈개승마 추출물 및 이의 분획물 제조**
- [0038] 분말로 제조한 눈개승마 200 g당 15배량(w/v)의 80% 에탄올을 가하여 24시간 동안 3회 추출한 다음, 상기 추출된 추출액은 여과지(Whatman No.4, England)로 여과하였다. 상기 여과한 여액을 40℃ 수욕 상에서 회전진공농축기(EYELA A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 제거하고 감압 및 농축한 후 동결 건조하여 눈개승마 에탄올 추출물을 제조한 후 4℃ 이하에서 냉장보관하였다.
- [0039] 눈개승마 분획물은 상기 제조된 눈개승마 에탄올 추출물에 증류수를 넣어 녹인 후, n-헥산(n-hexane) 용액을 1:1이 되게 혼합하고 분획깔대기(separating funnel)를 이용하여 분획한 후 회전진공농축기로 감압 및 농축하여 n-헥산(n-hexane) 분획물을 얻었다. 상기와 동일한 방법으로 클로로포름(chloroform), 에틸 아세테이트(ethyl acetate) 및 n-부탄올(n-butanol)을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻었고 최종 남은 용액은 물 분획물이라 칭하였다. 모든 과정은 3회 반복 실시하였다. 상기 얻어진 눈개승마 분획물은 메탄올로 용해하여 실험에 사용하였다.
- [0040] **3. 항산화 활성 분석**
- [0041] **3-1. 총 폴리페놀 화합물 함량**

[0042] 폴리페놀 화합물 함량은 페놀성 물질인 인몰리브덴산(phosphomolybdic acid)과 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법을 이용하여 측정하였다. 1 mg/mL 농도로 메탄올에 용해시킨 시료액 0.2 mL에 Folin-Ciocalteu's 페놀 시약(Sigma, USA) 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 후 3분간 실온에서 반응시켰다. 여기에 10% 탄산나트륨(Na_2CO_3) 용액 3 mL를 가하여 압실에서 1시간 동안 방치한 후 상등액을 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 갈산(Sigma, MO, USA)을 이용하여 검량 곡선을 작성한 후 함량 계산에 활용하였다.

[0043] **3-2. DPPH 라디칼(DPPH radical) 소거능 측정**

[0044] DPPH 라디칼 소거능은 DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, sigma)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois법을 활용하였다. 추출물 및 각 분획물을 농도별(0.1, 0.3, 0.5, 0.7 및 1.0 mg/mL)로 제조한 시료 0.2 mL에 0.2 mM DPPH 0.6 mL를 가하고 볼텍스 믹싱(vortex mixing)한 후 실온에서 15분간 반응시키고 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하고 DPPH의 환원에 의한 흡광도 감소를 계산하였다. 무처리구와 처리구의 값을 비교하여 자유 라디칼 소거활성을 결정하였으며, 이때 IC_{50} (mg/mL)은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 값을 50% 감소시키는 추출물의 농도를 나타냈으며, 또한 기존의 항산화제인 아스코르브산(ascorbic acid)의 DPPH 라디칼을 측정하여 비교하였다.

[0045] DPPH 라디칼 소거능(DPPH-radicals scavenging activity, $\%$) = $(1-A/B) \times 100$

[0046] A: 시료 흡광도(absorbance of sample)

[0047] B: 대조구 흡광도(absorbance of blank)

[0048] **3-3. ABTS 라디칼 소거능(ABTS radical scavenging activity) 측정**

[0049] ABTS 라디칼 소거능 측정은 Pellegrin 등의 방법에 의해 측정하였다. 7 mM ABTS와 140 mM 과황산칼륨($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)을 5 mL:88 μL 로 섞은 후 어두운 곳에서 14~16시간 동안 방치하였다. 이를 무수 에탄올(absolute ethanol)과 1:88의 비율로 섞은 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 시료용액 50 μL 와 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7 ± 0.002 가 되도록 조절한 ABTS 용액 1 mL를 30초 동안 섞은 후 2.5분간 항온처리(incubation)하고 734 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식에 의해 라디칼 소거능을 계산하였다.

[0050] ABTS 라디칼 소거능(radical scavenging activity, $\%$) = $(1 - \text{시료구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$

[0051] **3-4. FRAP(Ferric-reducing antioxidant potential) 측정**

[0052] 각 추출물 및 분획물의 FRAP 측정은 Benzie 및 Strain의 방법을 참고하여 측정하였다. FRAP 시약(FRAP reagent)은 25 mL 아세트이트 버퍼(300 mM, pH 3.6)를 37°C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma) 5 mL과 20 mM 황산철(FeSO_4) 2.5 mL을 가하여 제조하였다. 상기 제조된 FRAP 시약 0.9 mL에 1 mg/mL의 농도로 용해시킨 각각의 눈개승마 추출물 및 분획물 0.03 mL와 증류수 0.09 mL를 넣은 다음 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 593 nm에서 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 블랭크(blank)는 시료 대신 메탄올을 넣어 측정하였다. 아스코르브산(ascorbic acid)을 1 mg/mL 농도로 제조하고 FRAP를 측정하여 시료구와 비교하였으며, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5 및 5 mM의 농도로 반복하여 작성한 황산철(FeSO_4)의 검량식에 대입하여 환산하였다.

[0053] **3-5. 환원력(Reducing power) 측정**

[0054] 환원력은 Oyaizu의 방법에 따라 측정하였다. 농도별로 희석한 각 추출물 및 분획물(0.1~1 mg/mL) 1 mL에 200 mM 소듐 포스페이트 버퍼(sodium phosphate buffer, pH 6.6) 1 mL와 페리시안화칼륨(potassium ferricyanide, Sigma) 0.25 mL를 혼합하였다. 상기 혼합물을 50°C에서 20분 동안 항온처리(incubation)한 후 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid, 10%, w/v) 0.25 mL를 첨가한 후 10분 동안 3000 rpm으로 원심분리하였다. 상기 원심분리한 상정액(0.5 mL)에 탈이온수(0.5 mL)와 1% 염화제2철(ferric chloride, 0.1 mL, Sigma)을 첨가하고, 자외선/적외선 분광광도계(UV/Visible spectrophotometer, Shimadzu UV-1800, Shimadzu Co.,

Kyoto, Japan)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3-6. SOD 유사 활성(Superoxide dismutase-likely activity) 측정

Marklund와 Gudrun 방법의 변법을 이용하여 시료의 SOD 유사 활성을 측정하였다. 즉, 시료 0.1 g에 50 mM 트리스-카코딜산 버퍼(tris-cacodylic acid buffer, TCB, pH 8.2) 10 mL를 가한 후, 0.1 N 수산화나트륨(NaOH)과 염산(HCl)으로 pH를 8.2로 조절하였다. 상기 용액 0.9 mL에 20 mM 피로갈롤(1,2,3-benzenetriol, Sigma. Co, 10 mM HCl을 용매로 하여 제조) 0.1 mL을 첨가한 후 1 mL 피펫으로 3회 혼합하여 2분 후 420 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

SOD 유사 활성(%)=(1-(A-B/C))×100

A: 시료의 420 nm에서 흡광도

B: 피로갈롤 무첨가 버퍼의 420 nm에서 흡광도

C: 시료 무첨가 버퍼의 420 nm에서 흡광도

4. 티로시나아제(tyrosinase) 저해 활성

눈개승마의 티로시나아제 저해 활성은 Yagi 등의 방법에 따라 측정하였다. 0.175 M 소듐 포스페이트 버퍼(Sodium phosphate buffer, pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL와 시료용액 0.1 mL을 혼합한 용액에 버섯 티로시나아제(mushroom tyrosinase, 110 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시킨 후, 생성된 DOPA 크롬(chrome)을 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 티로시나아제 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 나타내었다.

티로시나아제 저해 활성(%) = (1-(A-B/C))×100

A: 시료의 475 nm에서 흡광도

B: 효소 무첨가 버퍼의 475 nm에서 흡광도

C: 시료 무첨가 버퍼의 475 nm에서 흡광도

5. 항균활성 분석

5-1. 디스크 확산법(disc diffusion assay)에 의한 항균활성 측정

각 추출물의 항균활성은 각 균주를 대상으로 디스크 확산법으로 측정하였다. 측정에 사용된 균주는 그람 양성균 3종류와 그람 음성균 3종류로 한국생명공학연구원에서 분양받아 사용하였고 사용된 배지 조건은 하기 표 1과 같다. 항균시험용 평판배지는 계대 배양된 각 균주를 멸균 면봉을 이용하여 100 μL씩 도말하여 준비하였다. 시료는 디스크(disc) 당 0.1, 0.5 mg이 되도록 페이퍼 디스크(8 mm)에 천천히 흡수시키고 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 후 평판 배지 위에 밀착시킨 상태로 30~37℃에서 24시간 동안 배양한 후 디스크 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

표 1

항균활성에 사용한 균주 및 배양조건

	종	배지	온도(℃)
그람 양성균 (Gram positive bacteria)	바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)	NA/NB	30
	바실러스 서브틸리스(<i>Bacillus subtilis</i>)	NA/NB	30
	스타필로코커스 아우레우스(<i>Staphylococcus aureus</i>)	NA/NB	30
그람 음성균 (Gram negative bacteria)	대장균(<i>Escherichia coli</i>)	NA/NB	30
	살모넬라 엔테리카(<i>Salmonella enterica</i>)	NA/NB	37
	슈도모나스 에루기노사(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	NA/NB	37

[0071] 5-2. 최소저해농도(minimum inhibition concentration, MIC) 측정

[0072] 항균력이 나타난 눈개승마 클로로포름(chloroform) 분획물의 MIC 측정은 항균활성 측정 방법과 같이 디스크 확산법으로 측정하였다. 눈개승마 클로로포름 분획물의 고형물 함량이 5, 10, 25 및 50 ug/mL이 되도록 페이퍼 디스크(paper discs, 8 mm)에 흡수시키고 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시킨 후 평판 배지 위에 밀착시킨 상태로 30~37℃에서 24시간 동안 배양한 후 디스크 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)으로 측정하였다.

[0073] 6. 항바이러스 활성 측정

[0074] 6-1. 바이러스 및 세포 배양

[0075] 인플루엔자 바이러스 A(Influenza virus A PR8 strain)를 배양하기 위해 MDCK 세포, porcine epidemic diarrhea virus(PEDV, KPED-9 strain)와 Pseudorabies virus(PRV, YS400 strain)를 배양하기 위해 Vero 세포가 사용되었다. 그리고 bovine rotavirus(BRV, P44 strain)를 배양하기 위해 MA104 세포가 사용되었으며, 이 세포들을 배양하기 위해 최소 필요 배지(MEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum(FBS) 및 0.01% antibiotic-antimycotic이 사용되었다. 그리고 Influenza A virus(PR8 strain), PEDV(KPED-9 strain), BRV(P44 strain)를 배양하기 위해서 각각 2.5, 10 ug/ml의 트립신(trypsin, sigma)이 첨가되고 FBS가 무첨가된 MEM을 사용하였다.

[0076] 6-2. 눈개승마 추출물에 의한 세포 독성(cytotoxicity) 실험

[0077] Vero, MDCK, MA-104 세포를 96 웰 세포 배양 플레이트에 3×10^4 만큼 분주하고 20시간 동안 배양하였다. 그리고, 눈개승마 추출물을 $10^1 \sim 10^4$ 로 희석하여, 각 4개 웰(well)씩 분주하고, 3일간 배양하였다. 현미경 상에서 세포의 세포병변효과(cytopathic effect, CPE)를 확인하여 생존능력(viability)을 측정하였다.

[0078] 6-3. 항바이러스 효과(antiviral effect) 측정

[0079] Vero, MDCK, MA-104 세포를 96 웰 세포 배양 플레이트에 3×10^4 만큼 분주하고 20시간 동안 배양하였다. 눈개승마 추출물에 의한 세포 독성(cytotoxicity) 실험을 통해 선택한 150 ug/ml의 눈개승마 추출물 50 ul와 각각의 바이러스를 $10^1 \sim 10^4$ 희석하여, 50 ul를 눈개승마 추출물과 섞어 주고 1시간 30분 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에 정치하였다. 그리고 세포가 자라고 있는 96 웰 세포 배양 플레이트의 배지를 버리고, 바이러스와 눈개승마 추출물 혼합액 100 ul를 분주하였다. 3일 후 바이러스가 일으키는 CPE를 통해 바이러스의 적정 농도(titer)를 Reed 및 Muench 방법을 이용하여 50% tissue culture infective dose(TCID₅₀)를 측정하였다. PEDV의 경우 CPE를 보이지 않았기 때문에 immunofluorescence assay(IFA) 방법을 통해 적정 농도(titer)를 측정하였다. 상기 방법은 배양 3일 후 세포를 PBS로 세척하고, 70% 아세톤으로 세포를 고정한 후, 항-PEDV 스파이크 단백질 단클론 항체(3F12, 제노바이오택)를 첨가하여 1시간 동안 방치하고 세척한 후, 항-마우스 IgG-FITC 항체를 첨가하여 1시간 동안 방치하고 세척한 후, 형광 현미경(Olympus, Japan)에서 바이러스의 감염(infection)을 확인하는 방법이다. 그리고 동시에 눈개승마 추출물을 첨가하지 않고 바이러스만 배양하여 눈개승마 추출물에 의해 바이러스 전염성(infectivity)의 감소 정도를 비교하였다.

[0080] 7. 통계처리

[0081] 모든 실험은 3회 이상 반복 실시하였으며, 얻어진 결과들은 SPSS 14.0 (Statistical Package for Social, SPSS Inc., Chicago IL, USA) 소프트웨어를 이용하여 유의적 차이가 있는 항목에 대해서 던칸다중범위검정(Duncan's multiple range test)으로 $p < 0.05$ 수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

[0082] 실시예 1: 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 추출 수율

[0083] 눈개승마 80% 에탄올 추출물의 추출 수율과 상기 추출물을 용매별로 분획한 분획물의 80% 에탄올 추출물에 대

한 추출 수율(dry basis, %)을 측정한 결과를 표 2에 나타내었다. 눈개승마 80% 에탄올 추출물에 대하여 용매 별로 분획한 후 추출 수율을 측정한 결과, 눈개승마 물 분획물 52.84%, n-부탄올(n-butanol) 분획물 19.82%, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물 12.76%, n-헥산(n-hexane) 분획물 12.34%, 클로로포름(chloroform) 분획물 2.25% 순으로 나타나, 물 분획물이 다른 분획물에 비해 가장 높은 수율을 나타내었다.

표 2

[0084]

눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 추출 수율

용매	수율(% w/w)
80% 에탄올 추출물 ¹⁾	29.25
80% 에탄올 추출물의 분획물 ²⁾	
n-헥산 분획물	12.34
클로로포름 분획물	2.25
에틸아세테이트 분획물	12.76
n-부탄올 분획물	19.82
물 분획물	52.84

[0085]

¹⁾ 수율(%) = 추출물의 무게/건조샘플의 무게 × 100

[0086]

²⁾ 수율(%) = 분획물의 무게/80% 에탄올 추출물의 무게 × 100

[0087]

실시예 2: 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 총 폴리페놀(total polyphenol) 함량 분석

[0088]

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 분자구조와 분자량을 가진다. 이들은 페놀 하이드록실기(phenolic hydroxyl, OH)를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하여, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다.

[0089]

눈개승마 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량은 표 3에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량은 에틸아세테이트 분획물(335.88 ± 2.26 mg/g) > n-부탄올 분획물(185.70 ± 0.24 mg/g) > 80% 에탄올 추출물(157.43 ± 0.94 mg/g) > n-헥산 분획물(146.25 ± 0.09 mg/g) > 클로로포름 분획물(132.15 ± 0.57 mg/g) > 물 분획물(115.01 ± 0.33 mg/g) 순으로 유의적인 차이를 보였으며, 주로 에틸아세테이트 분획물에 폴리페놀함량이 다량 존재함을 확인할 수 있었다.

표 3

[0090]

눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 총 폴리페놀(total polyphenol) 함량

용매	폴리페놀 함량(mg/g GAE ¹⁾)
80% 에탄올 추출물	157.43 ± 0.94 ^{2)c3)}
n-헥산 분획물	146.25 ± 0.09 ^d
클로로포름 분획물	132.15 ± 0.57 ^e
에틸아세테이트 분획물	335.88 ± 2.26 ^a
n-부탄올 분획물	185.70 ± 0.24 ^b
물 분획물	115.01 ± 0.33 ^f

[0091]

¹⁾ GAE : 갈산 당량(gallic acid equivalents)

[0092]

²⁾ 평균 ± 표준편차(n=3)

³⁾ 같은 칸(a~f)에서 서로 다른 문자는 $p<0.05$ 에서 유의적인 차이가 있다.

실시예 3: 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 DPPH 라디칼(DPPH radical) 소거능

DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 517 nm에서 강한 흡수 스펙트럼을 보이나 페놀성 화합물과 같이 수소에 전자를 제공해 주는 전자공여체와 반응하게 되면 전자 수소 라디칼(hydrogen radical)을 받아 페녹시 라디칼(phenoxy radical)을 생성하게 되어 흡수 밴드도 사라지게 되고 안정한 분자가 된다.

눈개승마 추출물 및 분획물의 DPPH 라디칼(DPPH radical) 소거활성은 표 4와 같으며, 검체 농도에 따른 항산화 활성 변화 곡선으로부터 산화를 50% 억제하는 농도인 IC_{50} 으로 나타내었다. IC_{50} 값은 에틸아세테이트 분획물에서 0.06 mg/mL, n-부탄올 분획물에서는 0.25 mg/mL으로 분획물 중 높은 활성을 나타내어 대조구인 아스코르브산과 비교해도 뒤떨어지지 않는 활성이 있는 것으로 나타났다. 그러나, 상기 분획물에 비해 80% 에탄올 추출물과 n-헥산, 클로로포름 및 물 분획물은 낮은 활성을 나타내었다.

표 4

눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 DPPH 라디칼(DPPH radical) 소거능

용매	DPPH 라디칼 소거능(mg/mL ¹⁾)
80% 에탄올 추출물	$0.50 \pm 0.01^{2)d3)}$
n-헥산 분획물	0.78 ± 0.01^c
클로로포름 분획물	0.98 ± 0.02^b
에틸아세테이트 분획물	0.06 ± 0.00^f
n-부탄올 분획물	0.25 ± 0.00^e
물 분획물	1.17 ± 0.02^a
아스코르브산	0.03 ± 0.00^g

¹⁾ 수소공여능을 50% 억제하는 농도

²⁾ 평균±표준편차(n=3)

³⁾ 같은 칸(a~g)에서 서로 다른 문자는 $p<0.05$ 에서 유의적인 차이가 있다.

실시예 4: 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거 활성은 추출물들의 상대적인 항산화효과 측정인 수소공여 항산화제(hydrogen-donating antioxidant)와 연쇄 절단 항산화제(chain breaking antioxidant) 모두 측정할 수 있는 방법이다. 또한 수성상(aqueous phase) 모두에 적용이 가능하며, 표준물질의 사용으로 추출물의 상대비교가 가능하도록 과황산칼륨(potassium persulfate)과의 반응에 의해 생성된 ABTS+ 자유 라디칼이 추출물 속의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색으로 탈색되는 것을 이용한 것이다.

눈개승마 추출물 및 분획물의 ABTS 라디칼 소거 활성은 표 5에 나타내었다. 0.5 mg/mL의 농도에서 에틸아세테이트 분획물이 $99.16 \pm 0.09\%$ 로 가장 높게 나타나, 대조구인 아스코르브산($99.42 \pm 0.15\%$)의 활성과 비교시 상기 분획물의 활성이 뒤떨어지지 않음을 알 수 있었으며, n-부탄올 분획물도 $89.29 \pm 0.64\%$ 의 높은 활성을 나타내었다. 또한 80% 에탄올 추출물이 $72.96 \pm 0.32\%$, 클로로포름 분획물이 $39.57 \pm 0.87\%$, n-헥산 분획물이 $28.83 \pm 0.33\%$ 를 나타내었다.

표 5

[0104]

눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 ABTS 라디칼 소거능

용매	ABTS 라디칼 소거능(%)
80% 에탄올 추출물	$72.96 \pm 0.32^{1)c2)}$
n-헥산 분획물	28.83 ± 0.33^e
클로로포름 분획물	39.57 ± 0.87^d
에틸아세테이트 분획물	99.16 ± 0.09^a
n-부탄올 분획물	89.29 ± 0.64^b
물 분획물	17.20 ± 0.09^f
아스코르브산	99.42 ± 0.15^a

[0105]

¹⁾ 평균 $\pm$ 표준편차(n=3)

[0106]

²⁾ 같은 칸(a~f)에서 서로 다른 문자는 $p < 0.05$ 에서 유의적인 차이가 있다.

[0107]

실시예 5: 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 환원력

[0108]

눈개승마 추출물 및 분획물의 농도를 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 및 1.0 mg/mL로 각각 제조하여 첨가한 후 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정한 결과는 도 1에 나타내었다. 환원력은 700 nm에서의 흡광도 수치로 나타내며, 환원력이 클수록 녹색에 가깝게 발색되고 흡광도의 수치가 높게 나타난다. 에틸아세테이트 분획물의 흡광도 수치가 2.69 ± 0.07 로 가장 높게 나타났으며, 80% 에탄올 추출물 2.37 ± 0.03 , n-부탄올 분획물 1.74 ± 0.03 , n-헥산 분획물 0.76 ± 0.04 , 물 분획물 0.56 ± 0.02 , 클로로포름 분획물 0.38 ± 0.05 순으로 높은 흡광도 수치를 나타내었다. 모든 용매 분획물은 농도가 증가함에 따라 흡광도 수치가 유의적으로 증가하였으나, 에틸아세테이트 분획물은 1.0 mg/mL의 농도에서 유의적으로 낮게 나타났다.

[0109]

실시예 6: 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 FRAP(Ferric-reducing antioxidant potential)

[0110]

FRAP 값은 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine(Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 파란색의 ferrous tripyridyltriazine(Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 방법이다. 실험 결과 눈개승마 에틸아세테이트 분획물의 FRAP 값은 5.39 ± 0.02 mM로 가장 높게 나타났으며, n-부탄올 분획물(1.63 ± 0.05 mM), 80% 에탄올 분획물(1.39 ± 0.06 mM), n-헥산 분획물(1.08 ± 0.03 mM), 클로로포름 분획물(0.65 ± 0.01 mM), 물 분획물(0.22 ± 0.00 mM) 순으로 FRAP 값을 나타내었다(표 6).

표 6

[0111]

눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 FRAP

용매	FRAP 값(mM)
80% 에탄올 추출물	$1.39 \pm 0.06^{1)d2)}$
n-헥산 분획물	1.08 ± 0.03^e
클로로포름 분획물	0.65 ± 0.01^f
에틸아세테이트 분획물	5.39 ± 0.02^b
n-부탄올 분획물	1.63 ± 0.05^c
물 분획물	0.22 ± 0.00^g
아스코르브산	9.09 ± 0.24^a

[0112] ¹⁾ 평균±표준편차(n=3)

[0113] ²⁾ 같은 칸(a~g)에서 서로 다른 문자는 $p<0.05$ 에서 유의적인 차이가 있다.

[0114] **실시예 7: 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 SOD 유사 활성 분석**

[0115] SOD는 항산화 효소로서 세포에 해로운 환원 산소종을 과산화수소로 전환 시키는 반응($2O_2^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하는 효소이다. SOD에 생성된 과산화수소(H_2O_2)는 페록시다아제(peroxidase)나 카탈라아제(catalase)에 의하여 무해한 물 분자와 산소분자로 전환시켜 산소 상해로부터 생체를 보호하는 기능을 가진다.

[0116] SOD 유사 활성 측정을 위해 산화효소인 피로갈롤(pyrogallol)과 눈개승마 추출물 및 분획물을 1.0 mg/mL의 농도로 반응시킨 결과를 표 7에 나타내었다. 눈개승마의 80% 에탄올 추출물, n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 n-부탄올 분획물은 $57.17 \pm 1.60 \sim 80.76 \pm 0.61\%$ 의 활성을 나타내었으나, 물 분획물은 $15.55 \pm 1.32\%$ 로 가장 낮은 활성을 나타내었다. SOD 유사 활성은 총 폴리페놀의 함량이 높은 순에 따라 높은 활성을 나타내었다.

표 7

[0117] 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 SOD 유사 활성

용매	SOD 유사 활성(%)
80% 에탄올 추출물	$66.49 \pm 1.31^{1)d2)}$
n-헥산 분획물	67.82 ± 0.49^d
클로로포름 분획물	57.17 ± 1.60^e
에틸아세테이트 분획물	80.76 ± 0.61^b
n-부탄올 분획물	72.34 ± 0.79^c
물 분획물	15.55 ± 1.32^f
아스코르브산	99.95 ± 0.06^a

[0118] ¹⁾ 평균±표준편차(n=3)

[0119] ²⁾ 같은 칸(a~f)에서 서로 다른 문자는 $p<0.05$ 에서 유의적인 차이가 있다.

[0120] **실시예 8: 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 티로시나아제(tyrosinase) 저해 활성**

[0121] 티로시나아제(tyrosinase)는 멜라닌 생합성 과정의 중요 효소로서 피부노화 및 색소침착을 일으키며 식품의 갈변을 일으키는 원인으로 알려져 있다. 눈개승마 추출물 및 분획물을 대상으로 0.1, 0.5, 1 및 5 mg/mL의 농도로 각각 희석하여 티로시나아제(tyrosinase) 저해활성을 검색하였다(도 2). 눈개승마 추출물 및 분획물의 티로시나아제 저해 활성은 농도에 따라 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 분획물 중 에틸아세테이트 분획물이 $25.22 \pm 2.38 \sim 59.08 \pm 0.98\%$ 로 가장 높은 티로시나아제 저해활성을 나타내었고, 그 다음 80% 에탄올 추출물이 $21.25 \pm 1.43 \sim 44.81 \pm 1.70\%$ 로 유의적으로 높은 활성을 나타내었다.

[0122] n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물 및 물 분획물은 1 mg/mL의 농도까지 분획물간의 유의차를 나타내지 않았으나, 5 mg/mL의 농도에서는 물 분획물이 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 눈개승마 추출물의 분획물 중에서 n-헥산 분획물 및 클로로포름 분획물은 티로시나아제 저해를 나타내는 생리활성 물질이 비교적 적으나 에틸아세테이트 분획물에는 티로시나아제 저해를 나타내는 생리활성 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 여겨진다.

[0123] 실시예 9: 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 항균활성

[0124] 눈개승마 추출물 및 분획물에 대한 항균활성을 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 3종의 그람 양성 세균과 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*) 및 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 3종의 그람 음성 세균으로 구성된 총 6종의 세균에 대하여 디스크 확산법으로 실시한 결과는 표 8에 나타내었다.

[0125] 눈개승마의 클로로포름 분획물은 0.1 mg/디스크의 농도에서 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 14 mm, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 12.5 mm, 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 10.8 mm 및 대장균(*Escherichia coli*) 20.7 mm의 저해환 크기를 나타내어, 상기 4종류의 세균에 대해 항균활성이 높았다. 에틸아세테이트 분획물은 0.5 mg/디스크의 농도에서 대장균(*Escherichia coli*) 17.2 mm의 저해환 크기를 나타내었으나, 클로로포름 분획물에 비해 낮게 나타났다.

표 8

[0126] 눈개승마 추출물 및 용매 분획물의 항균활성

미생물	저해환 크기(size of clear zone, mm)		
	용매	농도(mg/disc)	
		0.1	0.5
바실러스 세레우스 (<i>Bacillus cereus</i>)	80% 에탄올 추출물	¹⁾ -	-
	n-헥산 분획물	-	-
	클로로포름 분획물	14.0	20.0
	에틸아세테이트 분획물	-	-
	n-부탄올 분획물	-	-
	물 분획물	-	-
바실러스 서브틸리스 (<i>Bacillus subtilis</i>)	80% 에탄올 추출물	-	-
	n-헥산 분획물	-	-
	클로로포름 분획물	12.5	21.3
	에틸아세테이트 분획물	-	-
	n-부탄올 분획물	-	-
	물 분획물	-	-
스타필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	80% 에탄올 추출물	-	-
	n-헥산 분획물	-	-
	클로로포름 분획물	10.8	20.0
	에틸아세테이트 분획물	-	-
	n-부탄올 분획물	-	-
	물 분획물	-	-
대장균 (<i>Escherichia coli</i>)	80% 에탄올 추출물	-	-
	n-헥산 분획물	-	-
	클로로포름 분획물	20.7	28.5
	에틸아세테이트 분획물	-	17.2
	n-부탄올 분획물	-	-
	물 분획물	-	-
살모넬라 엔테리카 (<i>Salmonella enterica</i>)	80% 에탄올 추출물	-	-
	n-헥산 분획물	-	-
	클로로포름 분획물	-	-
	에틸아세테이트 분획물	-	-
	n-부탄올 분획물	-	-
	물 분획물	-	-
슈도모나스 애루기노사 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	80% 에탄올 추출물	-	-
	n-헥산 분획물	-	-
	클로로포름 분획물	-	-
	에틸아세테이트 분획물	-	-
	n-부탄올 분획물	-	-
	물 분획물	-	-

¹⁾ 데이터 없음.

실시예 10: 눈개승마 클로로포름 분획물의 최소저해농도(Minimum Inhibition Concentration, MIC)

페이퍼 디스크(paper disc)법의 결과를 바탕으로 눈개승마 80% 에탄올 추출물 유래 클로로포름 분획물에 감수성을 나타내었던 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 대장균(*Escherichia coli*)에 대해서 눈개승마 클로로포름 분획물의 최소저해농도를 조사한 결과는 표 9에 나타내었다. 눈개승마 클로로포름 분획물의 최소저해농도는 그람 양성균인 대장균에 대해서 25 ug/mL, 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대해서 50 ug/mL을 나타내었으나, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)는 50 ug/mL 이하의 농도에서 항균활성이 나타나지 않았다.

표 9

눈개승마 클로로포름 분획물의 최소저해농도

균주	다양한 농도에서 성장(ug/mL)				MIC (ug/mL)
	5	10	25	50	
바실러스 세레우스	¹⁾ +	+	+	¹⁾ -	50
바실러스 서브틸리스	+	+	+	+	N/D ²⁾
스타필로코커스 아우레우스	+	+	+	+	N/D
대장균	+	+	-	-	25

¹⁾ + : 성장, - : 성장하지 않음.

²⁾ 50 ug/mL 이하의 농도에서 최소저해농도를 발견하지 못함.

실시예 11: 눈개승마 추출물 및 분획물의 항바이러스 효과

화학 합성물인 경우 상당히 협소한 작용 범위로 인해 제한된 치료 효과 및 다양한 독성이 있는 것이 사실이다. 식물 추출물(herbal extract)의 경우 화학적으로 합성된 의약품에 비해 부작용이 적다는 장점이 있기 때문에 세균, 진균, 바이러스의 방어나 치료제로 널리 사용되고 있다. 따라서 현재까지 식물 추출물(herbal extract)에 의한 항균 및 항바이러스 효과에 관한 연구들이 많이 행해지고 있다.

이 실험에서 사용된 바이러스는 Influenza virus A(PR8 strain), PEDV(KPED-9 strain), BRV(p44 strain), PRV(YS 400 strain)이다. Influenza virus A는 Orthomyxoviridae에 속하며 6개의 분절 형태의 단가닥 negative strand RNA를 가지고 있으며, 감염 시 호흡기에 증상을 일으킨다. PEDV는 Coronaviridae에 속하고 단가닥 positive strand RNA를 가지고 있으며 돼지에서 장관계 질병을 야기한다. BRV는 Reoviridae에 속하고, 양가닥의 positive strand RNA 가지고 있으며, 송아지 설사증을 일으킨다. PRV는 Herpesviridae에 속하고, 약 200 kb의 긴 DNA를 가지고 있는 바이러스로 주로 돼지가 감염되며 유산, 사산 및 생식 문제를 일으키고 있다. 이들 바이러스는 각각 다양한 핵산 양상을 띄고 있으며, 각자의 바이러스가 속하는 과마다 사람에서 감염하여 유사 질병을 일으키는 바이러스가 존재하고 있다.

본 발명의 눈개승마 추출물은 수용성인 것은 PBS에 녹였고 수용성이 아닌 것들은 메탄올에 녹였기 때문에 세포에 독성을 나타낼 수 있다. 따라서 세포 독성을 나타내지 않은 최고의 농도를 선택하고자 세포 독성 실험을 수행하였다. 수행 결과 독성을 나타내지 않은 최고 농도인 150 ug/ml의 농도를 선택하였다.

추출물의 농도를 150 ug/ml로 희석하여, 각각의 바이러스와 반응시키고 세포에 처리하여, 바이러스의 전염성(infectivity)를 측정한 결과는 표 10에 나타내었다. 그 결과, 눈개승마 80% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물은 항바이러스 효과를 나타내었으며, 그 효과는 바이러스마다 다른 양상을 나타내었다. 특히 PEDV의 경우, 눈개승마 80% 에탄올 추출물에서 100배 이상의 바이러스 억제 효과를 나타내었으며, 눈개승마 에틸아세테이트 분획물의 경우 모든 바이러스를 강하게 억제하는 것으로 확인되었다.

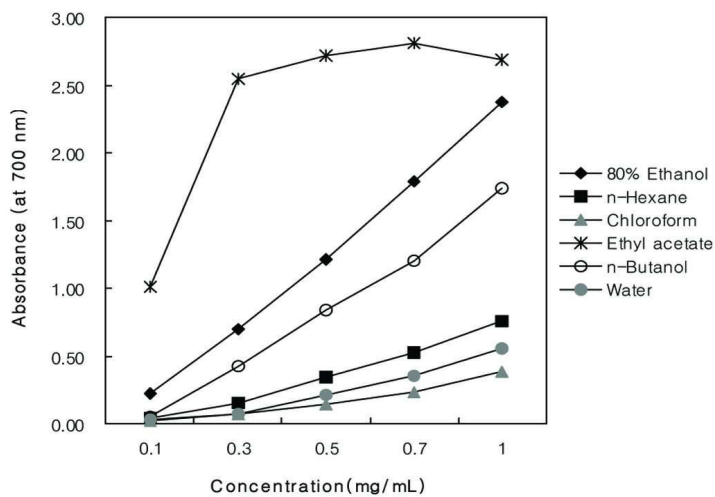
표 10

눈개승마 추출물 및 분획물의 항바이러스 효과

용매	Log TCID ₅₀			
	Influenza virus A	PEDV	BRV	PRV
80% 에탄올 추출물	2.67	0	3	2.5
에틸아세테이트 분획물	2.5	1	2.5	2.5
배지(media)	3.5	2.66	4.3	4.3

도면

도면1



도면2

