

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2006-0117645
A23L 2/00 (2006.01) (43) 공개일자 2006년11월17일

(21) 출원번호 10-2005-0040079
(22) 출원일자 2005년05월13일

(71) 출원인 박민경
충청남도 홍성군 홍성읍 오관리 현대아파트 104동 1503호
김복현
충청남도 아산시 신창면 창암리 2구 10-4번지

(72) 발명자 박민경
충남 홍성군 홍성읍 오관리 현대아파트 104동 1503호
김복현
충남 아산시 신창면 창암리 2구 10-4번지

(74) 대리인 정상섭

심사청구 : 있음

(54) 천년초 추출액 및 엑스의 제조방법

요약

본 발명은 천년초(*Opuntia humifusa*)를 이용하여 독성물질로부터 간손상 예방 효과가 있는 천년초 추출액 및 엑스 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 천년초줄기 및 열매를 이용하여 천년초 추출액 및 천년초 엑스를 제조하는 방법에 관한 것으로써, 줄기를 동결건조하고, 동결건조한 천년초 줄기를 분쇄하는 단계; 상기 분쇄물에 몇배의 증류수를 가하여 진탕추출한 후 원심분리하는 단계;를 거쳐 제조되는 천년초 추출액 및 천년초 줄기와 열매를 세척하고 몇배의 정제수를 가하여 추출하는 단계; 추출액을 여과하고 균질화하는 단계; 및 균질액을 열탕 살균하여 천년초 엑스를 제조하는 것으로, 천년초 추출액 및 천년초 줄기와 열매 혼합 엑스가 독성물질인 사염화탄소에 의해 유발되는 간 수치(AST, ALT) 증대와 항산화 효소활성 저하를 억제하므로 간을 보호하는 효과를 갖는다.

색인어

천년초, 줄기 물 추출액, 줄기 열매 혼합 엑스, 사염화탄소, 기능성 식품

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 천년초(*Opuntia humifusa*)를 이용하여 독성물질로부터 간손상 예방 효과가 있는 천년초 추출액 및 엑스 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 천년초줄기 및 열매를 이용하여 천년초 추출액 및 천년초 엑스를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 줄기를 동결건조하고, 동결건조한 천년초 줄기를 분쇄하는 단계; 상기 분쇄물에 몇배의 증류수를 가하여 진탕추출한 후 원심분리하는 단계;를 거쳐 제조되는 천년초 추출액 및 천년초 줄기와 열매를 세척하고 몇배의 정제수를 가하여 추출하는 단계; 추출액을 여과하고 균질화하는 단계; 균질액을 열탕 살균하여 천년초 엑스를 제조하는 것으로, 천년초 추출액 및 천년초 줄기와 열매 혼합 엑스가 독성물질인 사염화탄소에 의해 유발되는 간 수치(AST, ALT) 증대와 항산화 효소활성 저하를 억제하므로 간을 보호하는 효과를 갖는다.

손바닥 선인장은 민간에서 화상치료, 천식, 종기, 신경통 등 여러 질병에 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 다양한 생리, 약리학적 효과가 과학적으로 입증되고 있다. 이(Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD. 1997. Compositions of *Opuntia ficus-indica*. Korean J Food Sci Technol 29: 847-853.)는 손바닥 선인장의 성분 특성을 조사하여 주성분인 가용성 무질소물, 주요 무기질 및 아미노산 성분을 밝혔다. 또한 비타민 C는 열매와 줄기에 각각 163.8과 71.2mg%이며 총 폴리페놀 화합물이 국내산 식물성 식품과 비교하여 상당히 높은 것으로 보고하였다. 박(Park EH, Hwang SE, Kahng JH. 1998. Anti-inflammatory activity of *Opuntia ficus-indica*. J Pharm Soc Korea 42: 621-626.)은 손바닥 선인장 에탄올 추출물 및 추출물 분획이 카라기닌(carrageenan) 부종법 및 아세트산(acetic acid)을 이용한 진통실험에서 항염증 및 진통억제 효과가 있는 것으로 보고하였다. 위(Wie MB. 2000. Protective effect of *Opuntia ficus-indica* and *Saururus Chinensis* on free radical induced neuronal injury in mouse cortical cell cultures. J Pharm Soc Korea 44: 613-619.)는 활성산소 및 아라키돈산으로 유도된 생쥐 뇌의 글리아 및 신경세포 손상에 대해 손바닥 선인장 열매 추출물이 우수한 보호효과 있음을 보고하였다. 문(Moon CJ, Kim SJ, Ahn MJ, Lee SJ, Park SJ, Jeong KS, Yoon DY, Choe YK, Shin TK. 2000. Effect of *Opuntia ficus-indica* extract on immune cell activation. Korean J Life Sci 10: 362-364.)은 손바닥 선인장의 에탄올 추출물이 대식세포를 자극하여 IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha의 분비를 유도하며 배양 림프구의 증식을 촉진하여 면역계를 활성화할 수 있음을 시사하였다. 이(Lee NH, Yoon JS, Lee BH, Choi BW, Park KH. 2000. Screening of the radical scavenging effects, tyrosinase inhibition and anti-allergic activities using *Opuntia ficus-indica*. Kor J Pharmacogn 31: 412-415.)는 손바닥 선인장 줄기 및 열매 추출물이 DPPH 라디칼에 대한 소거활성 및 티로시나아제(tyrosinase)의 억제작용이 있어 화장품 첨가제로 활용될 수 있음을 시사하였다. 다양한 화학물질로 유도된 위점막 손상에 대한 보호효과(Lee EB, Hyun JE, Li DW, Moon YI. 2002. Effect of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* stem on gastric damages in rats. Arch Pharm Res 25: 67-70.), 알록산(alloxan) 및 스트렙토조토신(streptozotocin) 유도 당뇨 모델 동물에서 혈당강하 효과(Shin J, Han MJ, Lee YC, Moon YI, Kim DH, Han MJ, Lee YC, Moon YI, Kim DH. 2002. Antidiabetic activity of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* on db/db mice. Kor J Pharmacogn 33: 332-336.), 선인장에서 분리된 플라보노이드의 신경보호효과(Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YY, Lee YH, Jin C, Lee YS, Cho J. 2003. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. Brain Res 965: 130-136.), 혈청 LDL 콜레스테롤 저하(Cardenas Medellin ML, Serna Saldivar SO, Velazco de la Garza J. 1998. Effect of raw and cooked nopal(*Opuntia ficus-indica*) ingestion on growth and profile of total cholesterol, lipoproteins, and blood glucose in rats. Arch Latinoam. Nutr 48: 316-323.)효과 등도 보고되었다. 이와 같은 다양한 효능, 효과를 고려할 때 손바닥 선인장은 건강증진을 위한 기능성 식품 및 약품 소재로 연구, 개발할 가치가 높은 것으로 사료된다. 멕시코와 미국 등지에서는 요리 재료로 사용하거나 잼, 젤리, 주스, 기타 가공품으로 식용하고 있으며 건강기능 식품으로도 개발하였다. 한국에서는 제주도에서 자생 또는 경작되어 다류 등의 가공식품으로 이용되고 있다.

천년초(*Opuntia humifusa*)는 (주)천년초가 충남 아산지역에서 대량 재배하는데 성공한 *Opuntia*속 선인장으로 제주도의 백년초(*Opuntia ficus-indica*)가 길고 굵은 가시가 많고 1 ~ 2m까지 자라는 반면, 솜털 가시를 가지며 약 30cm로 자란다. 여름에는 물을 가까이하여 성장 번식하고 휴면기인 겨울에는 비닐하우스가 없는 노지에서도 생존하며 병충해에 강한 특징을 지니고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명에서는 천년초를 이용하여 간 손상 예방 효과가 있는 건강기능 식품을 개발하고자 천년초 줄기 물 추출액 및 줄기 열매 혼합 엑스 제조방법을 제공하고자 하며 또한, 줄기 물 추출액과 줄기 열매 혼합 엑스가 독성물질(사염화탄소)로부터 간을 보호하는 효과를 비교 확인하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

상기와 같은 목적을 달성하기 위해서 본 발명은 다음과 같은 기술적 구성을 갖는다.

천년초 줄기를 -35 ~ -45℃로 동결한 후 동결건조기에서 20 ~ 25시간 건조하는 단계(S1); 동결건조한 천년초 줄기를 분쇄기로 분쇄하는 단계(S2); 동결건조한 천년초 줄기 분말의 총 중량에 대하여 1 ~ 30배의 증류수를 가하여 80 ~ 100℃에서 20 ~ 24시간 진탕추출하는 단계(S3); 2500 ~ 3300rpm에서 10 ~ 15분간 원심분리하는 단계(S4);를 거친 후 그 상등액을 사용하는 천년초 추출액 및

천년초 줄기와 열매를 1:9 ~ 9:1 중량비율로 칭량하여 세척하는 단계(S1'); 10 ~ 20배의 정제수를 가하고 100 ~ 130℃에서 5 ~ 7시간 추출하는 단계(S2'); 추출액을 여과하고 5%의 올리고당을 첨가하여 균질화하는 단계(S3'); 균질액을 85 ~ 95℃에서 10 ~ 30분간 열탕 살균하는 단계(S4');를 거쳐 천년초 엑스를 제조한다.

천년초 추출액 제조시, 동결건조단계(S1)에서 천년초줄기는 -35 ~ -45℃에서 동결하고 동결건조기에서 20 ~ 25시간 건조하는 것이나, -40℃에서 24시간으로 동결건조하는 것이 바람직하며, 상기 동결건조기는 랩콘코 동결-건조 시스템(Labconco Freeze-Dry System, Stoppering Tray Dryer가 부착됨, 랩콘코(Labconco Co., 미주리주 캠퍼스 시티 소재)사 제품)을 사용한다.

분쇄단계(S2)에서 분쇄기는 Waring blender(USA)를 사용한다.

진탕추출단계(S3)에서 천년초 추출액제조시 사용되는 증류수는 동결건조한 천년초 줄기 분말 총 중량에 대해 1 ~ 30배를 가하여 사용하는 것이나, 바람직하게는 20배의 증류수를 가하여 진탕추출한다. 또한, 진탕추출은 80 ~ 100℃에서 20 ~ 24시간동안 추출하는 것이나, 80℃를 유지하면서 24시간동안 추출하는 것이 바람직하다.

원심분리단계(S4)에서 원심분리는 2500 ~ 3300rpm으로 10 ~ 15분간 이루어지나, 바람직하게는 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 그 상등액을 사용하는 것이 좋다.

천년초 엑스 제조시, 세척단계(S1')에서 천년초 줄기와 열매는 중량비로써 1:9 ~ 9:1로 칭량하여 사용하는 것이나, 바람직하게는 5:5 비율로 칭량하여 사용하는 것이다.

추출단계(S2')에서 추출시 10 ~ 20배의 정제수를 가하는 것이나, 바람직하게는 12배의 정제수를 가하는 것이며, 상기 추출은 100 ~ 130℃에서 5 ~ 7시간동안 추출하는 것이나, 바람직하게는 110℃에서 6시간동안 추출하는 것이다.

살균단계(S4')는 균질화하는 단계(S3')에서 제조된 균질액을 85 ~ 95℃에서 10 ~ 30분간 열탕 살균하는 것이며, 바람직하게는 90℃에서 20분간 열탕살균하는 것이다.

발명에서는 그 시약으로 Thiobarbituric Acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, epinephrine, hydrogenperoxide, glutathion(GSH), GSH-reductase, NADPH, t-butyhydroperoxide, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, indoxyl-β-D-glucuronide(IBG), vitamin C, folin-ciocalteu reagent, gallic acid는 Sigma(USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 일반 특급시약을 사용하였다.

본 발명에 따른 구성을 실시예를 통해 보다 구체적으로 살펴보도록 한다.

실시예 1: 천년초 추출액 제조방법

(주)천년초(충남 아산)에서 재배한 천년초 줄기를 -40℃에서 동결한 후 동결건조기(LABCONCO, USA)로 24시간 건조한다. 건조된 천년초를 분쇄기(Waring blender, USA)로 분쇄하여 분말로 만들고 20배의 증류수를 가하여 90℃에서 24시간 진탕추출한 후 3000rpm, 10분간 원심분리한 상등액을 천년초 추출액으로 사용한다.

실시예 2: 천년초 엑스의 제조방법

천년초 엑스는, 천년초 줄기와 열매를 5:5 비율로 칭량하여 세척한 후 약 12배의 정제수를 가하고 110℃에서 6시간 추출한다(추출물 3brix 이상). 추출액을 여과하고 5%의 올리고당을 첨가하여 균질화 한다. 균질액을 90℃에서 20분간 열탕 살균하여 제조한다.

실시예 3: 실험동물 및 처치

실험동물은 무게 120g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 (주)오리엔트(경기도 가평)로부터 구입하여 일주일간 온도 20±3℃, 상대습도 50±10%, 12시간 명암주기의 실험실 환경에 순화시킨 후 사용하였다. 사료는 (주)퓨리나코리아의 흰쥐사료를 사용하였으며 음용수는 자외선 살균한 물을 자유섭취 시켰다. 천년초 줄기 추출액 및 줄기 열매 혼합 엑스는 상압가열건조법으로 수분을 제거하고 고형분량을 측정하여 추출액은 0.5 g/kg 및 1 g/kg 체중이 되는 양을, 줄기 열매 혼합 엑스는 0.5 g/kg, 1 g/kg 및 1.5 g/kg 체중이 되는 양을 일정시간에 1일 1회 14일 동안 경구투여 하였다(표 1). 이때 각 군에서 투여 용량이 일정하도록 증류수를 이용하여 추출액 및 줄기 열매 혼합 엑스의 농도를 조절하였으며 대조군과 CCl₄ 군은 14일 동안 증류수를 경구투여 하였다. CCl₄는 올리브유로 희석하여(1:4) 2 ml/kg 체중(0.5 ml-CCl₄/kg)체중이 되도록 시료 마지막 투여 종료 3시간 후에 대조군(1군)을 제외한 모든 군에 복강주사하였다. CCl₄ 투여 24시간 후 ether로 마취시키고 개복하여 복부대동맥에서 혈액을 채취하였으며 간은 적출하여 생리식염수로 세척한 뒤 -70℃에 보관하며 분석에 사용하였다.

표1) 실험군

실험군	처치
1군	생리식염수(대조군)
2군	CCl ₄ (0.5ml/kg, i.p., 24 hours)
3군	CCl ₄ + 천년초 줄기 물 추출액(1g/kg, p.o., 2 weeks)
4군	CCl ₄ + 천년초 줄기 물 추출액(0.5g/kg, p.o., 2 weeks)
5군	CCl ₄ + 천년초 줄기 열매 혼합 엑스(1.5g/kg, p.o., 2 weeks)
6군	CCl ₄ + 천년초 줄기 열매 혼합 엑스(1g/kg, p.o., 2 weeks)
7군	CCl ₄ + 천년초 줄기 열매 혼합 엑스(0.5g/kg, p.o., 2 weeks)

실시에 4: 혈청 AST, ALT 및 ALP 활성 측정

AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase) 및 ALP(alkaline phosphatase) 활성은 혈액을 상온에서 15분간 방치한 뒤 3000rpm, 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 kit((Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd, Tokyo, Japan)를 사용하여 혈액자동분석기(Hitachi 700-110, Japan)로 측정하였다.

실시에 5: 지질과산화 반응 측정

간 조직을 0.15 M-KCl 용액을 이용하여 10%-균질액을 만들고 Mihar 등의 방법으로 Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)를 측정하였다(Mihara M, Uchiyama M, Fukuzawa K. 1980. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication and vitamin E deficiency. Biochem Med 23: 302-311.).

실시에 6: 항산화 효소 활성 측정

간조직을 0.25 M-sucrose 용액으로 균질화하고 600×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 효소원으로 사용하였다. Superoxide dismutase(SOD) 활성은 epinephrine의 자동산화를 이용한 방법으로 측정하였다(Misra HP, Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 247: 3170-3175.). 결과는 epinephrine의 자가 산화율을 50% 억제하는 효소 활성도를 1 단위로 하여 unit/mg protein으로 나타내었다. Catalase(CAT) 활성은 Claiborn(Claiborne A. 1986. Catalase activity. In CRC Handbook of method for oxygen radical research. Greenwald RA ed. CRC Press Inc. Florida. p 283.)의 방법에 따라 240nm에서 H₂O₂의 소모율을 측정하고 μmol/min/mg protein으로 계산하였다. GSH-Peroxidase(GSH-Px) 활성은 340 nm에서 NADPH의 감소를 측정하여 nmol/mni/mg protein으로 표시하였다(Del Maestro RF, McDonald W. 1986. Oxidative enzyme in tissue homogenates. In CRC Handbook of method for oxygen radical research. Greenwald RA ed. CRC Press Inc. Florida. p 291.). GSH-S-transferase(GST) 활성은 Habig(Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferase. J Biol Chem 249: 7130-7139.)의 방법으로 측정하고 nmol CDNB/min/mg protein으로 나타내었다.

실시예 7: Hydroxyl radical(OH⁻) 소거활성 측정

Fenton 반응($\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$)에 의해 OH⁻ 발생시키고 OH⁻에 특이적으로 반응하는 indoxyl- β -D-glucuronide를 발광제로 사용하여 화학발광기(Microtiterplate Luminometer, EG&G BertholdLB96P, Germany)로 측정하였다(Tsai CH, Stern A, Chiou JF, Chern CL, Liu TZ. 2001. Rapid and specific detection of hydroxyl radical using an ultraweak chemiluminescence analyzer and low-level chemiluminescence emitter: Application to hydroxyl radical-scavenging ability of aqueous extracts of food constituents. J Agric Food Chem 49: 2137-2141.). 활성정도는 vitamin C의 활성 능력과 비교하여 mole vit. C equiv/g으로 표시하였다.

실시예 8: 총 페놀함량 측정

총 페놀 화합물의 함량 측정은 folin-ciocalteu 시약으로 페놀 화합물을 발색시키고 분광광도계로 측정하였다(Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol 299: 152-178.). 결과는 표준물질로 gallic acid를 사용하여 mg gallic acid equiv/g으로 표시하였다.

실시예 9: 단백질 측정

간 조직 균질액의 단백질은 Bio-Rad(USA) 시약을 사용하여 측정하였다(Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.).

실시예 10: 통계처리

결과는 평균 \pm SD로 나타내었으며, 통계적 유의성은 ANOVA와 Tucky test로 검증하였다.

본 발명에 따른 실험결과는 다음과 같다.

혈청 AST, ALT 및 ALP 활성

표 2에서와 같이 사염화탄소를 처치한 군(2 군)의 혈청 AST, ALT 및 ALP의 활성은 대조군과 비교하여 각각 4.3, 4.7 및 1.2배 증가하였다. 반면, 줄기 열매 혼합 엑스를 1.5 g/kg 투여한 군(5군)의 AST, ALT 및 ALP의 활성은 CCl₄ 군과 비교하여 각각 약 45%, 55% 및 32% 감소하였다. 줄기 열매 혼합 엑스를 1 g/kg 투여한 군의 AST, ALT 및 ALP의 활성도 CCl₄ 군과 비교하여 각각 약 39%, 38% 및 22% 감소하였다. 0.5 g/kg의 투여에 의해서도 감소하는 경향을 보이나 통계적 유의성은 없는 것으로 나타났다. 천년초 줄기 물 추출액의 경우도 1 g/kg 투여(3 군)군에서 의해 AST, ALT 및 ALP의 활성이 CCl₄ 군과 비교하여 유의적으로 감소하였다.

사염화탄소는 cytochrome P450E1에 의해 활성화되어 trichloromethyl radical(CCl₃⁻)로 대사된다. 생성된 CCl₃⁻은 핵산, 단백질, 지질 등의 세포성분과 결합하여 세포기능을 손상시키며 또한 산소와 반응하여 trichloromethylperoxy radiaci(CCl₃OO⁻)을 생성하므로 지질과산화 반응을 개시하여 세포막의 투과성에 영향을 미치고 칼슘을 유출시키므로 세포 파괴 등 심각한 손상을 초래한다(Weber LW, Boll M, Stampfl A. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. Crit Rev Toxicol 33: 105-136.). 이외에도 사염화탄소는 다양한 기전으로 세포독성을 나타내며(Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. 1993. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 119: 275-279.) 세포가 손상되면 AST, ALT 및 ALP 등이 세포로부터 유출되어 혈청 농도가 증가하므로 이들 효소는 간 손상을 측정하기 위한 지표로 사용된다. 따라서 천년초 줄기 발효액을 14일간 처치한 군(5 ~ 6 군)에서 AST, ALT 및 ALP 활성이 줄기 열매 혼합 엑스 및 줄기 물 추출액 처치에 의해 감소하는 결과는 천년초 줄기 열매 혼합 엑스 및 줄기 물 추출액이 독성물질로부터 간을 보호하는 효과가 있음을 보여주고 있다.

표2) 줄기 열매 혼합 엑스 및 줄기 물 추출액 투여가 혈청 AST, ALT 및 ALP 활성에 미치는 영향

	AST(U/L)	ALT(U/L)	ALP(U/L)
1군	170.4±26.7 ^a	46.0±2.5 ^a	170.4±26.7 ^a
2군	738.4±60.4 ^b	217.0±20.9 ^b	170.4±26.7 ^b
3군	466.8±108.5 ^c	127.6±35.4 ^{cd}	170.4±26.7 ^a
4군	684.0±92.1 ^b	171.1±26.5 ^{bc}	170.4±26.7 ^{ab}
5군	407.8±67.2 ^c	96.2±34.4 ^d	170.4±26.7 ^a
6군	447.4±153.1 ^c	133.2±14.2 ^{cd}	170.4±26.7 ^a
7군	680.8±97.7 ^b	182.6±20.7 ^b	170.4±26.7 ^{ab}

(Means within the same column with different superscript are significantly different at 5% level by the Tukey test.)

간의 지질과산화 반응 및 항산화 효소 활성

사염화탄소의 투여에 의해 지질 과산화반응 산물인 TBARS가 대조군과 비교하여 2.1배 증가하였으며, 줄기 열매 혼합 엑스를 1.5 g/kg 투여한 군에서는 CCl₄ 군과 비교하여 약 45%의 감소를 보였다(표 3). 줄기 열매 혼합 엑스를 1 g/kg으로 투여한 군에서도 CCl₄ 군과 비교하여 약 38%의 감소를 보였다. 줄기 열매 혼합 엑스를 0.5 g/kg으로 투여한 군의 경우 CCl₄ 군과 비교하여 TBARS가 감소하는 경향을 보이거나 통계적 유의성은 없었다. 천년초 줄기 물 추출액을 1 g/kg 처치한 군에서도 TBARS가 유의적으로 감소하였다.

간세포의 항산화 효소활성을 측정한 결과, 사염화탄소에 의해 SOD의 활성이 약 30% 감소하였으며 천년초 줄기 열매 혼합 엑스 1.5 g/kg 및 1 g/kg 투여에 의해 CCl₄군과 비교하여 각각 41% 및 36%가 증가하였다(표 3). 천년초 줄기 물 추출액 1 g/kg 처치에 의해서도 사염화탄소에 의해 감소된 SOD 활성이 유의적으로 회복되는 결과를 보였다. CAT의 활성은 사염화탄소 처치에 의해 변화가 없는 것으로 나타났다(표 3).

표3) 천년초 줄기 열매 혼합 엑스 및 줄기 물 추출액 투여가 간의 지질과산화 반응, Superoxide dismutase 및 Catalase 활성에 미치는 영향.

	TBARS(nmol/mg protein)	SOD(U/mg protein)	CAT(μmol/mg protein)
1군	0.66±0.12 ^a	5.91±0.60 ^a	83.00±9.21 ^a
2군	1.39±0.14 ^b	4.11±0.49 ^b	80.80±8.19 ^a
3군	0.81±0.10 ^a	5.62±0.50 ^a	88.60±13.01 ^a
4군	1.12±0.17 ^b	5.01±0.68 ^{ab}	79.40±9.81 ^a
5군	0.76±0.11 ^a	5.82±0.50 ^a	88.00±10.51 ^a
6군	0.85±0.10 ^a	5.61±0.45 ^a	85.60±9.73 ^a
7군	1.14±0.18 ^b	4.88±0.30 ^{ab}	80.00±10.67 ^a

(Means within the same column with different superscript are significantly different at 5% level by the Tukey test.)

GSH-PX 활성도 사염화탄소 처치에 의해 변화가 없는 것으로 나타났다(표 4).

GST의 경우, 사염화탄소에 의해 활성이 약 30% 감소하였으며 천년초 줄기 열매 혼합 엑스 1.5 g/kg 및 1 g/kg의 처치에 의해 CCl₄ 군과 비교하여 각각 56% 및 35% 회복되었다(표 4). 천년초 줄기 물 추출액 1 g/kg 처치에 의해서도 사염화탄소에 의해 감소된 GST 활성이 유의적으로 회복되었다.

이상의 결과는, 천년초 줄기 열매 혼합 엑스 및 물 추출액이 독성물질에 의해 초래되는 지질과산화 반응 증가를 억제하고 SOD 및 GST 등의 항산화 효소 활성 감소를 회복시키는 효과가 있음을 보여주고 있다.

표4) 천년초 줄기 열매 혼합 엑스 및 줄기 물 추출물 투여가 간의 Glutathion peroxidase 및 Glutathion-S-transferase 활성에 미치는 영향

	GSH-Px(nmol/mg protein)	GST(nmol/mg peotein)
1군	28.12±4.38 ^a	98.50±8.78 ^a
2군	27.84±4.01 ^a	68.67±6.39 ^b
3군	31.20±5.40 ^a	91.38±10.56 ^a
4군	27.26±4.91 ^a	80.82±9.17 ^{ab}
5군	34.30±5.47 ^a	99.10±10.93 ^a
6군	28.20±5.31 ^a	92.80±10.87 ^a
7군	29.0±5.24 ^a	82.80±9.09 ^{ab}

(Means within the same column with different superscript are significantly different at 5% level by the Tukey test.)

사염화탄소에 의해 유발된 세포손상에 있어서 지질과산화 반응은 중요한 역할을 하는데(Weber LW, Boll M, Stampfl A. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. Crit Rev Toxicol 33: 105-136.), 이는 CCl₃OO⁻ 뿐만 아니라 활성화된 Kupffer 세포와 호중구에 의한 과다한 활성산소 생성이 원인일 수 있다(Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. 1993. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 119: 275-279.). 과다하게 생성된 활성산소는 세포의 항산화계 균형에 영향을 미치고 산화적 스트레스를 유발하는데 선행된 연구결과를 보면 사염화탄소 처치 후의 항산화 효소 활성은 다양한 양상을 보이고 있다. Superoxide anion을 과산화수소로 전환시켜 활성산소로부터 세포를 보호하는 SOD의 경우, 사염화탄소 처치 후 감소하거나 변화가 없다는 보고가 있다.(Ohta Y, Kongo-Nishimura M, Matsura T, Yamada K, Kitagawa A, Kishikawa T. 2004. Melatonin prevents disruption of hepatic reactive oxygen species metabolism in rats treated with carbon tetrachloride. J Pineal Res 36: 10-17.; Jung SH, Lee YS, Lim SS, Lee S, Shin KH, Kim YS. 2004. Antioxidant activities of isoflavones from the rhizomes of Belamcanda chinensis on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. Arch Pharm Res 27: 184-188.; Chidambara Murthy KN, Jayaprakansha GK, Singh RP. 2002. Studies on antioxidant activity of pomegranate(Punica granatum) peel extract using in vivo models. J Agric Food Chem 50: 4791-4795.; Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, WU LY, Chou DS, Lin CH, SU CH, Sheu JR. 2003. Antioxidative and hepatoprotective effects of Antrodia camphorata extract. J Agric Food Chem 51: 3302-3308.; Szymonik Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Slomka M, Madro A, Celinski K, Wielosz M. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. J Hepatobiliary Pancreat Surg 10: 309-315.). H₂O₂를 물과 산소로 환원하는 CAT는 사염화탄소 처치 후 감소 또는 증가하였다.(Ohta Y, Kongo-Nishimura M, Matsura T, Yamada K, Kitagawa A, Kishikawa T. 2004. Melatonin prevents disruption of hepatic reactive oxygen species metabolism in rats treated with carbon tetrachloride. J Pineal Res 36: 10-17.; Jung SH, Lee YS, Lim SS, Lee S, Shin KH, Kim YS. 2004. Antioxidant activities of isoflavones from the rhizomes of Belamcanda chinensis on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. Arch Pharm Res 27: 184-188.; Chidambara Murthy KN, Jayaprakansha GK, Singh RP. 2002. Studies on antioxidant activity of pomegranate(Punica granatum) peel extract using in vivo models. J Agric Food Chem 50: 4791-4795.; Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, WU LY, Chou DS, Lin CH, SU CH, Sheu JR. 2003. Antioxidative and hepatoprotective effects of Antrodia camphorata extract. J Agric Food Chem 51: 3302-3308.; Szymonik Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Slomka M, Madro A, Celinski K, Wielosz M. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. J Hepatobiliary Pancreat Surg 10: 309-315.). GSH-Px는 지질과산화물(ROOH)을 환원하므로 산화적 스트레스로부터 보호 기능을 하는 효소이다. GSH-Px의 활성도 사염화탄소 처치에 의해 감소, 증가 또는 변화가 없는 다양한 결과가 보고 되었다(Jung SH, Lee YS, Lim SS, Lee S, Shin KH, Kim YS. 2004. Antioxidant activities of isoflavones from the rhizomes of Belamcanda chinensis on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. Arch Pharm Res 27: 184-188.; Chidambara Murthy KN, Jayaprakansha GK, Singh RP. 2002. Studies on antioxidant activity of pomegranate(Punica granatum) peel extract using in vivo models. J Agric Food Chem 50: 4791-4795.; Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, WU LY, Chou DS, Lin CH, SU CH, Sheu JR. 2003. Antioxidative and hepatoprotective effects of Antrodia camphorata extract. J Agric Food Chem 51:

3302-3308.; Szymonik Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Slomka M, Madro A, Celinski K, Wielosz M. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 10: 309-315.) GST는 약물대사 제2상 반응 효소로 친전자성 이물질 대사산물과 GSH의 포합을 촉매한다. 뿐만 아니라 GST는 지질과산화물을 환원하는 peroxidase의 활성이 있는 것으로도 보고되었다(Yang Y, Sharma R, Zimniak P, Awasthi YC. 2002. Role of alpha class glutathione S-transferase as antioxidant enzymes in rodent tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 182: 105-115.). 한편, 사염화탄소의 처치에 의해 간의 GST 활성은 감소되며 혈장에서의 활성은 증가하는데 이는 간 손상으로 인해 GST가 혈장으로 유출되기 때문인 것으로 보고되었다(Igarashi T, Muramatsu H, Ohmori S, Ueno K, Kitagawa H, Satoh T. 1988, Plasma glutathione S-transferase in carbon tetrachloride treated rats and its association to hepatic cytosolic isozymes. *Jpn J Pharmacol* 46: 211-216.). 이로 인해, 혈장 GST는 AST 보다 사염화탄소의 간독성을 더욱 민감하고 정확하게 나타내주는 지표로 제시되었다(Clarke H, Egan DA, Heffernan M, Doyle S, Byrne C, Kilty C, Ryan MP. 1997. Alpha-glutathione S-transferase(alpha-GST) release, an early indicator of carbon tetrachloride hepatotoxicity in the rat. *Hum Exp Toxicol* 16: 154-157.). 항산화 효소는 활성산소의 과다 생성에 의해 고갈될 수 있는 한편 화학물질에 의해 합성이 유도되기도 하므로 독성물질의 처치량, 기간 및 기타의 실험조건에 의해 다양한 결과를 보일 수 있다(Cao Z, Li Y. 2004. The chemical inducibility of mouse cardiac antioxidants and phase 2 enzymes in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 1080-1088.; Kono Y, Okada S, Tazawa Y, Kanzaki S, Mura T, Ueta E, Nanba E, Otsuka Y. 2002. Response of anti-oxidant enzymes mRNA in the neonatal rat liver exposed to 1,2,3,4-tetrachlorobenzop-dioxin via lactation. *Pediatr Int* 44: 481-487.) 따라서 항산화 효소활성의 증감은 세포의 homeostasis의 차원에서 비효소 형태의 항산화제를 포함한 총체적인 방어시스템의 변화와 함께 비교 해석되어야 할 것이다.

천년초 줄기 열매 혼합 엑스의 hydroxyl radical(OH⁻) 소거활성 및 총페놀 함량

천년초 줄기 열매 혼합 엑스는 표 5에 나타낸 것과 같이 건조 고형분량으로 하여 총 페놀화합물 함량이 4.63 mg/g이며 143.37 $\mu\text{mol vit. C eq/g}$ 의 OH⁻ 소거활성을 나타내었다.

표5) 천년초 줄기 열매 혼합 엑스의 총페놀 함량 및 OH⁻ 라디칼 소거활성

총 페놀 함량 (mg/g dry wt)	OH ⁻ 소거활성 ($\mu\text{mol vit. c eq/g dry wt}$)
4.63±0.91	143.37±6.98

사염화탄소로부터 간손상을 예방하는 물질의 작용기전에 관한 선행연구결과를 보면, silymarin은 항산화제로 작용하며 사염화탄소의 대사 중간산물이 간세포 지질에 결합하는 것을 억제하므로 간세포의 괴사를 감소하거나 소포체의 일산화 효소(monooxygenases)활성을 억제하므로 손상을 예방하는 것으로 보고되었다(Lettern P, Labbe G, Degott C, Berson A, Fromenty B, Delaforge M, Larrey D, Pessayre D. 1990. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochem Pharmacol* 39: 2027-2034.). 비타민 E도 지질과산화 반응을 억제하는 항산화제로 사염화탄소로부터 간세포를 보호한다(Biasi F, Albano E, Chiarpotto E, Corongiu FP, Pronzato MA, Maranari UM, Parola M, Dianzani MU, Poli G. 1991. In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. *Cell Biochem Funct* 9: 111-118.). 홍삼 사포닌은 cytochrome P450E1의 활성을 저해하므로 간에 대한 보호작용을 나타내는 것으로 보고되었다(Kim HJ, Chun YJ, Park JD, Kim SI, Roh JK, Jeong TC. 1997. Protection of rat liver microsomes against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation by red ginseng saponin through cytochrome P450 inhibition. *Planta Med* 63: 415-418.). 즉, 사염화탄소로부터 간손상을 예방하는 물질은 대사 활성화 효소를 억제하거나 항산화 활성을 통해 간세포를 보호하는 것으로 알려지고 있다. 천년초 줄기 열매 혼합 엑스 및 줄기 물 추출액이 어떠한 기전을 통해 사염화탄소로 유도된 간독성을 예방하는가에 대하여는 심도 있는 연구가 요구되나 페놀성 물질에 의한 OH⁻ 소거 활성이 사염화탄소에 의한 항산화 효소 활성감소 및 지질과산화 반응 증가를 억제하므로 간세포 손상을 감소시키는 한 요인으로 작용하였을 것으로 추정된다.

본 발명은 그 정신 또는 주요한 특징으로부터 이탈하는 일없이, 다른 여러 가지 형태로 실시할 수 있다. 전술한 실시예는 모든 점에서 단순한 예시에 지나지 않으며, 한정적으로 해석해서는 안된다. 본 발명의 범위는 특허청구의 범위에 의해서 나타나는 것으로서, 명세서 본문에 의해서는 아무런 구속도 되지 않는다. 다시, 특허청구범위의 균등범위에 속하는 변형이나 변경은, 모두 본 발명의 범위 내의 것이다.

발명의 효과

천년초 줄기 열매 혼합 엑스 및 줄기 물 추출액은 CCl_4 (0.5 ml/kg)에 의해 유발되는 혈청 AST, ALT 및 ALP 증가를 효과적으로 억제하고, 간의 지질과산화 반응을 감소시키며 SOD 및 GST의 활성을 회복시키는 효과가 있어 결과적으로 천년초 발효액은 독성물질로부터 간손상을 예방하는 건강기능성 식품으로서의 효능을 갖는다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

천년초 줄기를 20 ~ 25시간 동결 건조하는 단계(S1);

동결건조한 천년초 줄기를 분쇄하는 단계(S2);

동결건조한 천년초 줄기 분말의 총 중량에 대하여 1 ~ 30배의 증류수를 가하여 80 ~ 100℃에서 20 ~ 24시간 진탕추출하는 단계(S3);

2500 ~ 3300rpm에서 10 ~ 15분간 원심분리하는 단계(S4);를 거친 후 그 상등액을 사용하는 것을 특징으로 하는 천년초 추출액 제조방법.

청구항 2.

천년초 줄기 및 열매를 1:9 ~ 9:1 중량비율로 칭량하여 세척하는 단계(S1');

1 ~ 20배의 정제수를 가하고 100 ~ 130℃에서 5 ~ 7시간 추출하는 단계(S2');

추출액을 여과하고 5%의 올리고당을 첨가하여 균질화하는 단계(S3');

균질액을 85 ~ 95℃에서 10 ~ 30분간 열탕 살균하는 단계(S4');

를 거쳐 제조되는 것을 특징으로 하는 천년초 엑스의 제조 방법.