



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월14일
 (11) 등록번호 10-1407150
 (24) 등록일자 2014년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 36/73 (2006.01) A61K 36/738 (2006.01)
 A61P 25/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0112449
 (22) 출원일자 2012년10월10일
 심사청구일자 2012년10월10일
 (65) 공개번호 10-2014-0046233
 (43) 공개일자 2014년04월18일
 (56) 선행기술조사문헌
 Yakhak Hoeji, Vol. 37, No. 4, pp.365-369 (1993)*
 European Journal of Pharmacology, Vol. 621, pp.46-52 (2009)*
 Am J Physiol Regulntegr Comp Physiol, Vol. 296, pp.R1071-R1077 (2009)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 전남대학교산학협력단
 광주광역시 북구 용봉로 77
 한국인스팸(주)
 전라남도 화순군 동면 동농공길 17
 (72) 발명자
 서은진
 광주 북구 동림용산로 12, 406동 1204호 (동림동, 푸른마을주공4단지아파트)
 유양희
 광주 북구 호동로 100, 103동 1503호 (우산동, 현대아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 신동인

전체 청구항 수 : 총 2 항

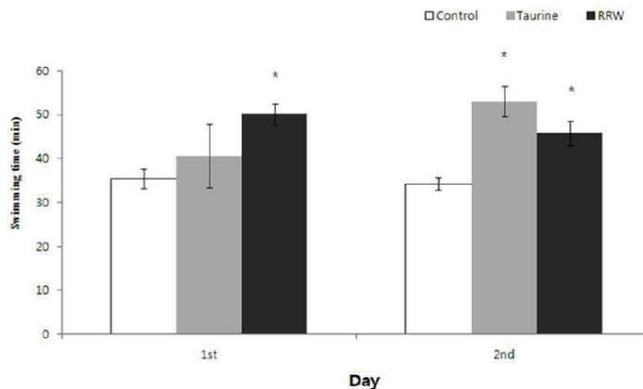
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 **해당화 추출물을 유효성분으로 함유하는 운동성 육체적 스트레스 관련 질환의 치료 및 예방을 위한 조성물**

(57) 요약

본 발명은 해당화 줄기 및 잎 추출물을 함유하는 조성물에 관한 것으로, 해당화 줄기 및 잎을 다양한 용매를 이용하여 추출, 농축하여 수득 가능한 분말 또는 엑기스를 포함하는 수면부족상태로 기인한 스트레스관련 질환에 대한 억제, 예방 및 개선을 위한 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명에 의한 해당화 줄기 및 잎 추출물은 랫트에서 수면박탈에 대항하여 생존율 증가, 꾸벅임 감소, 코티졸 함량 감소효과 및 신경세포 보호효과가 탁월함을 확인하였다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

전우진

광주 북구 설죽로 595, 106동 1703호 (일곡동, 롯데아파트)

김용재

광주 남구 효사랑길 14, 107동 907호 (봉선동, 포스코더샵아파트)

오규철

광주 남구 봉선로133번길 4, 7동 402호 (봉선동, 금호1차아파트)

김선오

전남 장흥군 안양면 우드랜드길 288,

이유현

서울 강남구 언주로 203, 1005호 (도곡동, 매봉아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 70011030

부처명 지식경제부

연구사업명 지역산업기술개발사업

연구과제명 지역 특산자원을 대상으로 항스트레스 및 전립선 건강 건강기능식품 소재화

기 여 율 1/1

주관기관 한국인스팜주식회사

연구기간 2010.11.01 ~ 2011.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

해당화 줄기 또는 잎의 물 추출물을 유효성분으로 함유하는 피로감, 지구력 저하증, 순발력 저하증, 또는 무기력증의 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

해당화 줄기 또는 잎의 물 추출물을 유효성분으로 함유하는 피로감, 지구력 저하증, 순발력 저하증, 또는 무기력증의 개선 및 예방용 건강기능식품.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명의 해당화 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 육체적 스트레스에 저항하는 효과가 탁월하므로 육체적 스트레스관련 질환에 대한 억제, 예방 및 개선에 유용하다.

배경기술

[0002] [문헌 1] Erikssen G et al., Lancet., 352(9130), 759-62, 1998

[0003] [문헌 2] Ji LL., Free Radic Biol Med., 18(6), 1079-86, 1995

[0004] [문헌 3] Khansari, D. N. et. al., Immunol., Today 11, 170-175

[0005] [문헌 4] Kim, K.j., et. al., Seoul International Sport Science Congress Proceedings., II, 817-825, 1994

[0006] [문헌 5] Pedersen, B. K., & Ullum, H., Med. Sci., Sports Exerc., 26(2), 140-146

[0007] [문헌 6] Nieman, D. C. et. al., Int. J. Sports Med., 15, 199-206, 1994

[0008] [문헌 7] Hoffman-Goetz, L, & Pederson, B. k., Immunology Today., 15, 382-387, 1994

[0009] [문헌 8] Clarkson, P.M. Food Sci. Nutr., 35, 131-141, 1995

[0010] [문헌 9] Sen, C.K., J. APPl. Physiol., 79, 675-686, 1995

[0011] [문헌 10] McEwen B. S., Brain Res., Dec 15;886(1-2),172-189, 2000

- [0012] [문헌 11] Cheng HY. et. al., *J Neurosci.*, 26(50), 12984-12995, 2006
- [0013] [문헌 12] Fulkerson WJ, Tang BY. *J Endor.*, 1979; 81: 135-141
- [0014] [문헌 13] Fell LR, *Proc Aust Anim Prod.*, 16: 203-206, 1986
- [0015] [문헌 14] Lee HJ., *Korean J Biotechnol Bioeng.*, 19(1), 67-71, 2004
- [0016] [문헌 15] Choi YS., *Korean J Biotechnol Bioeng.*, 8(3), 224-229, 1993
- [0017] [문헌 16] Murasc, T. et. al., *Am.J.Physiol. Regul.Integr.Comp Physiol.*,288, R708-R715, 2005
- [0018] [문헌 17] Singh, A. et. al., *J. Med. Food.*, 5,211-220, 2002
- [0019] [문헌 18] Bonen, A. et. al., *Med. Sci. Sports Exerc.*, 32,778-789, 2000
- [0020] [문헌 19] Keuchi,M. et. al., *J.Nutr. Sci. Vitaminol.*, 51, 40-44, 2005
- [0021] [문헌 20] Kim,K.M., *J Nutr.*, 128,1978-1983, 2001
- [0022] [문헌 21] You.Y.H., *Biosci. Bio technol. Biochem.*, 70(10), 2532-2535, 2006
- [0023] [문헌 22] Matsumoto K. et, al., *J Appl Physiol.*, 81, 1843-1849, 1996
- [0024] [문헌 23] Jung. KA., *Journal of Ethnopharmacology.*, 93, 75-81, 2004
- [0025] [문헌 24] Packer L. Oxidant, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sport Sci*, 15: 353-63, 1997
- [0026] [문헌 25] Qiumei Youa., et, al., *Toxicology and Applied Pharmacol.*, 230(1), 1-8, 2008

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0027] 본 발명은 해당화 추출물을 유효성분으로 함유하는 육체적 스트레스관련 질환을 치료 및 예방하는 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 최근 운동은 경쟁적 스포츠에서 벗어나 질병을 예방하고 건강을 증진시키는 영역으로 확대되고 있다. 규칙적이고 중증도의 운동은 심혈관질환, 암, 골다공증, 비만의 위험을 감소시키는 건강 효과를 제공한다. 인간의 수명 연장과 조기 사망의 위험을 감소시키는 것으로 알려진 바 있다(Erikssen G et al., *Lancet.*, 352(9130), 759-62, 1998). 그러나 운동 동안 산소의 소비가 증가하고 reactive oxygen species(ROS)의 생성이 증가하는 지구성 산소 소모 운동에서 산화적 스트레스의 가속화와 세포와 조직의 손상에 원인이 되는 것으로 보고된 바 있고(Ji LL., *Free Radic Biol Med.*, 18(6):1079-86, 1995), 내분비와 면역기능에 불균형을 초래할 수 있다(Khansari ea al., 1990; Kim, ea al., 1998; Nieman, ea al., 1994; Pedersen, & Ullum, 1994). 급격한 고강도 운동은 순환성 호르몬 농도에 정신적 스트레스 보다 더 크게 변화를 일으키는 요인으로 작용할 수 있다는 점이 알려진 바 있다(Hoffman-Goetz, L, & Pederson, B. k., *Immunology Today*, 15, 382-387, 1994).
- [0029] 운동 동안에 세포는 산소 섭취량의 증가, 산소의 부분적인 환원동안에 증가하는 중간대사물의 증가, 운동으로 인해 증가한 epinephrine과 다른 catecholamine들이 불활성화 될 때 산소 자유기를 산출하는 것, 운동으로 인한 젖산의 증가가 상대적으로 약한 자유기인 superoxide를 조금 더 강한 자유기인 hydroxyl radical로 바꾸는 것, 지나친 운동으로 인한 근육 손상이 세포막의 지질과산화를 가져오고, 염증으로 인해 손상된 조직에서 대식세포와 백혈구들이 다양한 자유기들을 생산하는 것 등으로 산화 대사가 증가하고 자유라디칼과 여러 형태의 반응성 높은 산소입자들이 산출된다(Clarkson, P.M. *Food Sci. Nutr.*, 35, 131-141, 1995). 이에 유산소 고강도 운동은 반응성이 높은 산소 입자들을 증가시켜 체내 항산화 방어계 이상의 자유라디칼들을 생산하고 체내 분자들의 지질과산화를 유발하고, 더 나아가서는 근육의 손상을 가져올 수 있다(Sen, C.K., *J. APPL. Physiol.*, 79, 675-686, 1995).
- [0030] 신경계, 내분비계, 면역계는 포유동물의 생리적 시스템 전역에 상호작용을 하고 있다. 이들은 환경적 변화에 적응할 수 있도록 작용하고 있다. 스트레스는 ‘a threat, real or implied, to the maintenance of a narrow range of vital homeostatic parameters necessary for survival’ (McEwen B. S., *Brain Res. Dec* 15;886(1-

2),172-189, 2000)로 정의 된다. 많은 연구에서 *in vivo* 스트레스 연구는 신경 정신적 이상 모델로 디자인된 실험동물을 대상으로 수행하고, 시간의 한계량, 정신적행동학적 변화를 stresser를 노출시켜 연구한다. 또한 지구력 운동 또는 순발력 운동을 부하하여 육체적 스트레스를 유발하며 운동 시간량, 근력, 혈액 바이오마커, 호르몬 함량 등을 연구한다.

[0031] Cortisol은 부신피질에서 분비되는 glucocorticoid이며, 그 종류로는 cortisol, corticosterone 및 cortisone 이 있으며 이들의 분비 및 대사 과정은 이미 잘 알려져 있다. 대부분의 포유동물은 cortisol이 대부분을 차지하지만, 반추류는 cortisol과 corticosterone의 농도가 비슷한 것으로 알려져 있다. ACTH의 자극에 의해 조절되는 혈중 cortisol 농도는 혈중으로 방출되는 양과 cortisol의 대사 속도에 따라 달라지기 때문에 대사속도에 큰 변화가 없으면 ACTH의 분비 자극에 따라 변동을 나타내게 된다. 혈중 cortisol농도는 동물과 사람에게서 부신피질 기능항진증과 부신피질 기능저하증의 진단을 위해 측정될 뿐만 아니라 동물이나 사람에서 스트레스의 정도를 파악하기 위한 측정 대상이 된다(Cheng HY. et, al., 2006; Fulkerson WJ. et, al., 1979; Fell LR. et, al., 1986).

[0032] 해당화 추출물을 대상으로 지구적 운동 스트레스를 부여하고 그에 따른 생리활성을 평가하고, 활성 추출물의 분자적 기작규명을 위해 효소활성 및 호르몬 분석 연구를 수행하였다. 또한 양성대조군과 활성 추출물을 대상으로 생리활성을 평가하고 향후 활성 추출물을 건강지향식품 및 건강기능식품의 소재로써 활용하기 위한 과학적 근거 자료를 제공하고자 하였다.

[0033] 해당화(*Rosa rugosa* Thunb.)는 장미과에 속하는 낙엽관목으로 가시에 털이 있으며 바닷가 모래땅에 잘 자란다. 이 식물의 잎, 꽃, 과실, 지하부 등에서 화학 성분 연구가 이루어져 있으며, 일본에서는 꽃의 색소를 천연 착색료로 이용하기도 하고 특히, 우리나라에서는 해당화 지하부를 당뇨병 치료제로 사용하고 있다. 그 외 생리활성 연구로는 항염증, 진경작용, 혈당 강하작용, 혈청 콜레스테롤치 저하작용, 혈압 강하작용, HIV protease 저해 활성 등이 보고되었다(Lee HJ., *Korean J Biotechnol Bioeng.*, 19(1), 67-71, 2004). 최근 흰쥐에 해당화 뿌리의 메탄올 추출물을 경구투여시 간장 중성지방의 현저한 감소 효과가 있음을 밝혔다(Choi YS., *Korean J Biotechnol Bioeng.*, 8(3), 224-229, 1993).

[0034] 녹차추출물을 투여한 마우스에서 지구적 운동능력을 높였다. 풍부한 폴리페놀을 포함하는 녹차는 항산화제로써 건강과 스포츠 수행력에 유익한 결과를 낳는다(Murasc, T. et. al., *Am.J.Physiol. Regul.Integr.Comp Physiol.*,288, R708-R715, 2005). 항산화 효과를 가진 케르세틴과 같은 보조물은 지구적 운동 수행력을 강화시켰다(Singh, A. et. al., *J. Med. Food*, 5,211-220, 2002).

[0035] 고강도의 운동은 조직이 젖산을 제거하는 량 이상의 젖산을 생산하여 혈중으로 젖산을 배출하고 이것은 피로의 원인이 된다(Bonen, A. et. al., *Med. Sci. Sports Exerc.*,32,778-789, 2000). 혈액의 젖산량은 피로 표지 인자이다. 연속적인 운동에 의한 혈중 젖산량의 증가는 영양보조물의 섭취에 의해 억제될 수 있다(Keuchi,M. et. al., *J.Nutr. Sci. Vitaminol.*, 51, 40-44, 2005).

[0036] 영양보조물은 운동에 의해 야기된 산화적 스트레스를 보호할 수 있고, 이것은 연속적인 신체 활동으로 인한 극도의 피로를 감소시킬 수 있다(Kim,K.M., *J Nutr.*,128,1978-1983, 2001).

[0037] 그러나, 상기 문헌의 어디에도 해당화 추출물을 유효성분으로 함유하는 육체적 스트레스 관련 질환에 대한 억제 활성에 대하여 개시되거나 제시된 바가 없다.

[0038] 이에 따라, 본 발명자들은 해당화 추출물을 제조하여 *in vivo*상 마우스에 경구투여하고 유영수조를 이용하여 한계유영운동능력을 평가하고, 운동 후 혈중 젖산량을 측정하여 해당화 추출물 투여 실험군이 대조군에 비하여 한계유영운동시간이 증가하고, 운동에 의한 혈중 젖산량이 대조군에 비하여 증가하지 않음을 밝혔다. 이에 해당화 추출물이 한계유영운동능력 향상 및 항피로 효과를 가지고 있고, 스포츠 음료 등 건강기능성 식품을 제조하는 원료로 해당화 추출물을 활용할 수 있음을 처음으로 확인하였고 이를 이용하여 육체적 스트레스관련 질환에 대한 억제, 예방 및 치료에 유용한 조성물을 구성하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0039] 상기 목적을 해결하기 위해 본 발명은 해당화 추출물을 유효성분으로 함유하는 육체적 스트레스 관련 질환의 치

료 및 예방용 약학조성물을 제공한다.

- [0040] 또한 본 발명은 해당화 추출물을 유효성분으로 함유하는 육체적 스트레스 관련 질환의 개선 및 예방용 건강기능 식품을 제공한다.
- [0041] 본원에서 정의되는 상기 해당화는 줄기, 꽃, 뿌리, 전초 등, 바람직하게는 줄기 또는 잎 부위를 포함한다.
- [0042] 본원에서 정의되는 상기 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 극성용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 20 내지 90% 물 및 주정 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.
- [0043] 본원에서 정의되는 상기 육체적 스트레스관련 질환은 육체적 스트레스로 기인한 질환을 통칭하며, 피로감, 지구력 저하증, 순발력저하증, 무기력증, 두통, 불면증, 근육통, 근육경직, 심계항진, 흉부 통증, 복부 통증, 구역, 진물, 사지 냉감, 안면홍조, 땀, 또는 면역력 저하증 등의 스트레스 장애, 구체적으로는 피로감, 지구력 저하증, 순발력 저하증, 또는 무기력증을 포함한다.
- [0044] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0045] 본 발명의 해당화 줄기, 꽃, 뿌리, 전초 등, 바람직하게는 줄기 또는 잎 재료를 동결 건조하여 마쇄한 후 시료 중량의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 2 내지 20배에 달하는 부피의 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 극성용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 20 내지 90% 물 및 주정 혼합용매 20 내지 120℃, 바람직하게는 30 내지 80℃에서 약 1 내지 72시간, 바람직하게는 2 내지 12시간 동안에서 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 열수 추출하여 추출한 후 감압여과 및 농축하여 본 발명의 해당화 추출물들을 수득할 수 있다.
- [0046] 또한 본 발명은 상기 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 해당화 추출물을 유효성분으로 함유하는 육체적 스트레스 관련 질환의 치료 및 예방을 위한 약학 조성물 및 건강기능식품을 제공한다.
- [0047] 상기에서 제조된 해당화 추출물을 대상으로 *in vivo*상 마우스에 경구투여하고 유영수조를 이용하여 지구적 유영 운동능력을 평가하고, 운동 후 혈중 젖산량을 측정하여 해당화 추출물 투여 실험군이 대조군에 비하여 지구적 유영운동시간이 증가하고, 운동에 의한 혈중 젖산량이 증가하지 않음을 밝혔다. 이에 해당화 추출물이 지구적 유영운동능력 향상 및 항피로 효과를 가지고 있고, 스포츠 음료 등 건강기능성 식품을 제조하는 원료로 해당화 추출물을 활용할 수 있음을 처음으로 확인하여 스트레스관련 질환에 대한 억제, 예방 및 치료에 유용함을 확인하였다.
- [0048] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 생약 추출물을 0.01 내지 99% 중량으로 포함한다.
- [0049] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 이에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 적어도 면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경

구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 추출물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러므로 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0053] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 및 직장 또는 정맥등의 방법을 통하여 투여 할 수 있다.

[0054] 또한 본 발명은 해당화 추출물을 유효성분으로 함유하는 육체적 스트레스 관련 질환의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품을 제공한다.

[0055] 본 발명의 추출물을 포함하는 건강기능식품은 육체적 스트레스 관련 질환의 개선 및 예방을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 침출차, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0056] 따라서 또한, 본 발명은 육체적 스트레스 관련 질환의 개선 및 예방 효과를 갖는 해당화 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품 또는 식품첨가제를 제공한다.

[0057] 본 발명의 추출물을 첨가 가능한 식품형태는 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 또는 건강보조 식품류인 식품 등을 포함한다.

[0058] 본 발명의 추출물은 스트레스 억제 및 예방을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0059] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물의 혼합물을 함유하는 것 외에 액체 성분에는 특별한 제한점은 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 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 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 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0060] 상기 외에 본 발명의 조성물은 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, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 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 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0061] 본 발명의 해당화 추출물을 대상으로 *in vivo*상 마우스에 경구투여하고 유영수조를 이용하여 지구적 유영운동능력을 평가하고, 운동 후 혈중 젖산량을 측정하여 해당화 추출물 투여 실험군이 대조군에 비하여 한계유영운동시간이 증가하고, 운동에 의한 혈중 젖산량이 증가하지 않음을 밝혔다. 이에 해당화 추출물이 지구적 유영운동능력 향상 및 항피로 효과를 가지고 있고, 스포츠 음료 등 건강기능성 식품을 제조하는 원료로 해당화 추출물을 활용할 수 있음을 처음으로 확인하였고, 스트레스관련 질환에 대한 억제, 예방 및 치료에 유용함을 확인하여 육체적 스트레스 관련 질환에 대한 억제, 치료, 예방 및 개선에 유용한 약학 조성물 또는 건강기능 식품을 제공한다

다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 본 발명의 시료 및 타우린의 지구적 운동 스트레스 억제 효과를 나타낸 도이며{마우스에 증류수 또는 타우린(500 mg/kg body weight), 또는 RRW 추출물을 투여(1 g/kg body weight/day)하고 수영시간은 7.5 L/min으로 측정하고 개개 수치는 평균(mean ± S.E.)으로 표기하고 막대(bar) 상단의 *표기는 대조군과의 유의적으로 상이함($p < 0.05$)},
- 도 2은 본 발명의 시료 및 타우린의 지구력 운동 후 혈중 젖산 수준에 미치는 효과를 나타낸 도이며{마우스에 증류수 또는 타우린(500 mg/kg body weight) 또는 RR 추출물을 투여(1 g/kg body weight/day)하고, 혈중 젖산 수준은 수영후에 측정하고 개개 수치는 개개 군의 6마리 마우스에서의 수치 평균(mean ± S.E.)으로 표기하고 막대(bar) 상단의 *표기는 대조군과의 유의적으로 상이함($p < 0.05$)},
- 도 3는 본 발명의 시료 및 타우린의 지구력 운동후 근육내 글리코겐 농도에 미치는 효과를 나타낸 도이며{마우스에 운동전 부형제, 타우린 (500 mg/kg body weight) 또는 RRW 추출물 시료(1 g/kg body weight/day)를 투여하고, 근육 글리코겐은 절개후 측정하고 개개 수치는 개개 군의 6마리 마우스에서의 수치 평균(mean ± S.E.)으로 표기하고 막대(bar) 상단의 *표기는 대조군과의 유의적으로 상이함($p < 0.05$)},
- 도 4는 본 발명의 시료 및 타우린의 실험 마우스의 MDA 수준에 미치는 효과를 나타낸 도이며{마우스에 운동전 부형제, 타우린 (500 mg/kg body weight) 또는 RRW 추출물 시료(1 g/kg body weight/day)를 투여하고, MDA 수준은 절개후 측정하고 개개 수치는 개개 군의 6마리 마우스에서의 수치 평균(mean ± S.E.)으로 표기하고 *표기는 대조군과의 유의적으로 상이함($p < 0.05$)},
- 도 5은 본 발명의 시료 및 타우린의 실험 마우스의 혈중 코티졸 수준에 미치는 효과를 나타낸 도이다{마우스에 운동전 부형제, 타우린 (500 mg/kg body weight) 또는 RRW 추출물 시료(1 g/kg body weight/day)를 투여하고, 혈중 코티졸 수준은 절개후 측정하고 개개 수치는 개개 군의 6마리 마우스에서의 수치 평균(mean ± S.E.)으로 표기하고 *표기는 대조군과의 유의적으로 상이함($p < 0.05$)}.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 이하, 본 발명을 하기 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0064] 단, 하기 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0065] 실시예 1. 해당화 줄기 및 잎 추출물의 제조

[0066] 본 연구에 사용된 해당화 지상부는 전라남도 장흥산으로 건조 해당화 지상부 14 kg에 10배 부피의 물(140 L)을 첨가하고 100℃에서 5시간 동안 추출기(COSMOS660, 경서기계산업)로 환류추출 한 후 100 mesh의 여과망이 부착된 여과조를 이용하여 여과한 후 상등액을 감압 및 농축한 후에 동결 건조하여 추출물을 제조되었다. 추출물은 900 g을 수득하여 하기 실험의 시료로 사용하였다. 본 연구에 사용된 시료인 해당화 추출물은 RRW 명명하였고 이 추출물은 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

[0067] 참고예 1. 실험재료의 준비

[0068] 활성이 입증된 양성대조군으로는 타우린을 사용하였다. 타우린의 투여는 운동으로부터 유도되는 산화적 스트레스를 감소시킨다는 보고가 있고(Dawson et al. 2004, Zhang et al. 2004), 근육수축과 운동 중에 GSH의 산화와 관련한 산화적 스트레스를 억제하는 효과를 가진다. 본 연구에 사용된 타우린은 JIANGSU YUANYANG PHARMACEUTIAL CO.에서 구입한 것을 사용하였고, 500 mg/kg body weight/day으로 경구투여 하였다.

[0069] 참고예 2. 실험동물

[0070] SPF (Specific pathogen free)의 ICR 4주령 웅성마우스를 구입하여 실험에 사용하였다((주) 오리엔트바이오, 경기도). 실험동물은 항온항습시스템을 갖춘 후드 내에서 5~6마리를 polycarbonate cage (278×420×200 mm)에 넣고, 실내온도 22± 2℃, 기류속도 13~18cm/sec, 환기횟수 10~20회/h, 기압차2~10mmH₂O, 명암주기 12시간: 7:00~19:00, 조도 150~300 Lux에서 사육하였다. 일주일에 2번씩 체중을 측정하여 정기적으로 외관을 관찰하고, 주기적으로 베딩을 갈아주어 청결을 유지하였다. 식이는 AIN-76으로 충분히 공급하였다.

[0071] **실험예 1. 해당화 추출물의 한계유영 운동 효능 평가**

[0072] 상기 실시예에서 얻은 해당화 추출물의 한계유영 운동 효능을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(You Y.H. et al., Biosci. Bio technol. Biochem., 70(10), 2532-2535, 2006).

[0073] 선행연구에 개시된 유영운동의 수조는 90×45×45 cm 크기이며 높이 35 cm 까지 물을 채운 후 수온을 34℃로 유지하여 실험하였다. 표면유속은 전압조절기가 연결되어있는 pump와 water flowmeter(type F45500, Blue white Co, Westminster, CA, USA)를 이용하여 물을 순환시키고 7.5 L/min의 유속을 유지시켜 본 실험에 사용되었다. 한계유영운동시간은 마우스가 더 이상 수영을 못하는 시점 즉, 마우스가 물속에 빠져 7초가 경과할 때까지 물 표면으로 올라오지 못하는 시점까지의 유영시간을 측정하였다(Matsumoto K. et, al., J Appl Physiol, 81, 1843-1849, 1996).

[0074] 실험은 총 18 마리의 mice를 일주일간의 예비사육기간을 거친 후 유속 7 L/min의 운동 강도에서 2번의 한계유영 운동 시간을 측정 후 평균 한계유영운동시간이 같도록 군당 6마리로 대조군(control)과 타우린 투여군(taurine), 해당화추출물 투여군(RRW)으로 나누었다. control 군은 증류수, taurine 군은 500 mg/kg body weight/day의 농도, RRW 군은 해당화 물추출물을 1 g/kg body weight/day의 농도로 training 없이 2주간 시료를 투여하였다. 2주 투여 후 한계유영운동을 실시할 때에는 3시간 전에 절식 시키고, 실험 2시간 전 시료를 경구투여하여 한계유영시간을 평가하였다.

[0075] 마우스의 한계 유영 운동시간은 추출물이 육체적 스트레스 억제 활성을 갖는지 평가하기 위해 수행하였고, 그 결과는 도 1에 나타내었다. 각 처리군의 초기 유영시간을 25.0분으로 차이가 나타나지 않도록 나누었다. 2주간 경구투여 후 이틀간격으로 수행한 한계 유영 운동에서 1회에는 control 군 35.5분, taurine 군 40.7분, RRW 군 50.1분으로 나타났고, RRW 투여는 control 군에 비하여 1.4배 통계적으로 유의하게 증가하였다. 2회 에는 control 군 34.3분, taurine 군 53.0분, RRW 군 45.8분으로 control 군에 비하여 taurine 군의 한계유영운동시간이 1.6배, RRW 군의 1.3배로 통계적으로 유의하게 증가하였다. Taurine 군과 RRW 군 간에는 통계적 유의 차이가 나타나지 않았다. 이로써 한계유영 운동 효능은 RRW 투여에 의해 증가되고 양성대조군인 taurine 투여와 유사한 결과를 나타내었다.

[0076] **실험예 2. 혈중 젖산 측정**

[0077] 상기 실시 예에서 얻은 해당화 추출물의 운동 후 혈중 젖산 수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(You.Y.H. et. al., Biosci. Bio technol. Biochem., 70(10), 2532-2535, 2006).

[0078] 유영운동 후(운동 15분) 실험동물의 꼬리의 정맥혈에서 혈액을 취하여 젖산 및 혈당 농도를 측정하였다. 혈중 젖산 측정은 테스트 스트립(ARKRAY, Kyoto, japan)을 사용하였다.

[0079] 유영운동 일정시간 후 혈중 젖산의 양을 평가한 결과는 도 2에 나타내었다. 대조군은 약 4.5 mg/dL로 나타났고, taurine 군은 2.9 mg/dL, RRW 군은 3.0 mg/dL로 나타났다. Control 군에 비하여 taurine 군과 RRW 군은 1.5 배로 통계적으로 유의하게 감소한 결과를 나타내었다. 젖산의 축적은 피로도를 의미하기 때문에 대조군과 비교하여 taurine과 RRW의 투여로 유영운동에 의한 육체적 스트레스가 억제됨을 알 수 있었다.

[0080] **실험예 3. 조직 내 글리코겐 양 측정**

[0081] 상기 실시예에서 얻은 해당화 추출물의 운동후 조직내 글리코겐 양에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Jung. KA., Journal of Ethnopharmacology., 93, 75-81, 2004).

[0082] 마지막 한계유영운동 후 1시간 식이를 공급하고 12시간 절식시킨 후, 마지막으로 시료(1 g/kg body weight/day)와 타우린(500 mg/kg body weight/day)를 경구투여하고 희생시켰다. 근육 조직(중간광근)을 적출하여 분석 전까지 -70℃에 보관하였다. 중간광근을 취하여 10배에 해당하는 30% KOH를 넣고 100℃에서 30분간 lysis 하여 분석할 시료를 준비하고, glass tube에 이를 100 uL씩 옮겼다. 이때 glycogen standard curve 작성을 위하여 시료와 함께 glycogen solution을 0, 100, 250, 500, 1000 ug/mL의 농도로 만들어 이 용액도 100 uL씩 옮긴다. 여기에 증류수를 400 uL 씩 분주하고, 0.2% anthrone solution을 황산에 만들어 이를 1 mL 씩 분주하여 잘 혼합하였다. 혼합 후 15 분간 ice에서 cooling하여 620 nm에서 흡광도를 측정하고 이 흡광도 값을 standard curve에 대입하여 mg glycogen/g tissue로 환산하여 계산하였다.

[0083] 각 실험군의 근육 글리코겐 함량을 측정한 결과는 도 3에 나타내었다. Control 군의 글리코겐 함량은 0.3 mg/g tissue, taurine 군은 0.4 mg/g tissue, RRW 군은 0.4 mg/g tissue 였다. control 군에 비하여 각각 1.4배, 1.5배 많은 함량을 나타내었다. Taurine 군과 RRW 군과의 유의적인 차이는 없었다. 이는 taurine과 RRW 투여가 근육 내 글리코겐 절약효과를 나타내는 것으로 한계 유영운동으로 인한 스트레스 억제효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0084] **실험예 4. 항산화계 활성 측정**

[0085] 상기 실시예에서 얻은 해당화 추출물의 분자수준의 항스트레스 기작을 규명하기 위하여 항산화계 활성을 측정하여 CAT, SOD, GPx, GR, GSH, MDA 등의 효소활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Packer L. Oxidant, antioxidant nutrients and the athlete. J Sport Sci, 15: 353-63, 1997).

[0086] 4.1 실험 과정

[0087] 과도한 운동은 인체 내 각종 활성산소 종(ROS)을 생산하게 된다. 이러한 활성산소 종은 인체 내 여러 항산화계의 작용에 의해 소거되나 자유 라디칼이 존재할 경우 이것은 운동능력을 저하시킬 수 있는 원인으로 작용할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 운동능력향상능이 확인된 해당화 추출물 투여 군을 대상으로 한계유영 운동 후 희생시켜 조직을 통해 항산화 효소활성 등을 측정함으로써 산화적 스트레스의 억제에 의한 운동능력향상 및 운동 스트레스 보호 기작을 평가하였다.

[0088] -70℃에 보관된 비복근 조직을 이용하여 근육의 항산화계 활성을 평가하였다. 간 무게의 10배에 해당하는 D-PBS를 넣어 균질화한 다음 13,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상층액을 희석시켜 사용하였다. 근육은 비복근을 사용하여 1.13% KOH를 함유하는 PBS로 lysis시킨 다음 13,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상층액을 희석시켜 사용하였다. 항산화계 활성 측정에 앞서 단백질 정량은 BSA (bovine serum albumine)를 표준곡선으로 사용하여 Bradford의 분석방법을 이용하였다. CAT, SOD, GPx, GR, GSH, MDA의 활성 및 함량 평가를 앞서 추출물을 투여한 평가방법과 동일하게 처리하여 분석하였다.

[0089] 4.2 Superoxide dismutase (SOD)

[0090] Superoxide dismutase 활성은 spectrophotometric method로 분석하였다. 96 well plate를 준비하고, sample과

blank 2 각 well에 sample 20 썩 분주하고 blank 1과 blank 3 각 well에 ddw 20 썩 분주하였다. 위의 모든 well에 0.75 mM WST-1 용액을 200 썩 분주한 뒤, blank 2와 3에 buffer 20 썩 분주하고 sample과 blank 1에 xanthine oxidase 용액을 20 썩 첨가하여 plate mix한 후, 27℃에서 20분간 반응시키고 250 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 superoxide anion radical inhibition rate(%)=[Abs. blank 1 - Abs. blank 3) - (Abs. sample - Abs. blank 2) / (Abs. blank 1- Abs. blank 3) × 100]의 계산식을 활용하여 %로 계산하고, SOD 효소 활성은 상용화된 SOD를 이용하여 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 U/ml 농도로 작성된 표준곡선을 활용하여 U/mg protein으로 환산하였다.

[0091] SOD는 반응성이 높으며 독성을 유발하는 자유라디칼인 superoxide anion radical을 과산화수소로 dismutation 시키는 역할을 담당하는 항산화 효소이다. SOD 활성은 표 1에 나타내었다. 근육조직에서는 SOD 활성이 각각 3.2, 4.4, 3.9 U/mg protein 이었고 control 군에 비하여 taurine 군과 RRW 군의 활성이 약 1.4배, 1.2배 높았다. SOD 활성을 평가한 결과 두 조직에서 모두 taurine, RRW 군이 지구적 운동 스트레스 보호에 관여하는 SOD의 활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[0092] 4.3 Catalase (CAT)

[0093] 과산화수소를 물과 산소로 변화시키는 카탈라제 활성은 Aebi 등의 spectrophotometric method로 분석하였다. 96 well plate를 준비하고, 조직액 10 에 20 mM H₂O₂ 용액 290 를 첨가하여 microplate reader의 kinetic method를 이용하여 3분간 240 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 카탈라제 효소의 활성은 U/mg protein으로 환산하였다.

[0094] CAT은 대부분 조직의 peroxisome에서 과산화수소를 물로 환원시켜 과산화수소 증가에 따른 조직 손상을 방어하는 효과를 갖고 있으며 GPx에 비해 Km 값이 높아 과산화수소 농도가 높을 때 주로 작용하는 효소로써 한계 운동성 산화스트레스 보호 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. CAT의 활성은 도 5에 나타내었다. 근육조직에서 활성이 각각 7.1, 8.1, 7.5 U/mg protein 로 나타났다. 간과 근육의 CAT 활성을 평가한 결과 taurine과 RRW 군이 한계유형 운동 스트레스 보호에 관여하는 CAT의 활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[0095]

[0096] 4.4. Glutathione peroxidase (GPx)

[0097] Glutathione peroxidase 역시 과산화수소를 물로 환원시키는데 중요한 역할을 하는 효소이다. 이 효소의 측정은 측정할 sample 20 에 3.5 mM glutathione reduced form 120 , 0.5U/mL glutathione reductase를 첨가한 후, 2.5 mM NADPH를 첨가하였다. 마지막으로 30 mM tert-Butyl Hydroperoxide를 넣어 반응시킨 후 340 nm에서 1분 간격으로 4분 동안 흡광도를 측정하여 계산식에 대입하여 값을 측정하였다.

[0098] GPX는 저농도의 과산화수소에 작용하여 산화스트레스를 보호하며, Se을 함유하는 항산화계 효소로써 체내에서 NADP를 전자수용체로 하여 환원형 GSH를 산화형 GSSG, 물 및 기타 과산화물을 생성하는 반응을 촉매함으로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산화스트레스를 억제하는 효소이다. GPx 활성은 표 1에 나타내었다. 근육조직에서 그 활성이 각각 0.11, 0.12, 0.13 U/mg protein 이었고 control 군에 비하여 RRW 군의 활성이 약 1.1배 통계적으로 유의적으로 높았다. 간과 근육의 GPx활성을 평가한 결과 두 조직에서 모두 taurine, RRW 군이 지구적 운동 스트레스 보호에 관여하는 GPx의 활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[0099] 4.5. Glutathione (GSH)

[0100] Glutathione은 사람의 경우 95 kDa의 분자량을 가지는 4량체 효소로서, 숙주 항산화 방어 시스템에 있어 중요한 역할을 담당하는데, 이 효소는 CAT가 과산화수소의 방어에 1차적으로 작용하여, 기타 제거하지 못한 과산화수소의 탈독성에 관여한다. 이 효소의 측정은 kerboom 등의 방법을 수정하여 412 nm에서 1분 간격으로 5분 동안 노란색인 5-thio-2-mitrobensoic acid의 생성 정도를 측정하여 계산하였다.

[0101] 비효소적 생체 산화스트레스 보호 시스템의 주요 구성물질인 환원형 GSH은 glutamic acid, cysteine, glycine으로 된 tripeptide로 cysteine의 SH⁻기에 기인되어 환원성을 가진 GSH가 되며 이는 산화스트레스에 의해 쉽게 산화되어 hexapeptide인 산화형 GSSG로 GSH 함량은 표 1에 나타내었다. 근육조직에서 그 함량이 각각 19.8, 23.2, 20.1 umole/mg protein 이었고 control 군에 비하여 taurine 군에서 GSH 함량이 통계적으로 유의하게 높아졌다. 근육조직에서 GSH활성을 평가한 결과 RRW 군이 한계유형 운동 스트레스 보호에 관여하는 GSH의 활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[0102] 4.7. Glutathione reductase (GR)

[0103] GR의 활성도는 NADPH의 존재 하에서 GSSG의 환원을 촉매하므로 NADPH가 NADP⁺로 산화하게 하는데, 이때의 흡광도 감소를 340 nm에서 측정하였다.

[0104] GR은 생체 내 산화적 스트레스에 의해 생성된 GSSG를 GSH로 빠르게 전환시키는 역할을 담당하며 항산화계의 redox potential을 유지시키는 역할을 하는 효소로 알려져 있다. GR 활성은 표 1에 나타내었다. 간조직에서는 활성이 각각 2.3, 2.2, 2.0 U/mg protein 이었다. 근육조직에서 그 활성이 각각 0.2, 0.2, 0.2 U/mg protein 이었다. 대조군과 투여군간 통계적 유의 차이는 나타나지 않았다.

표 1

[0105] 실험 마우스의 근육성 항산화활성에 미치는 효과

Group	SOD	CAT	GPx	GSH
	U/mg protein	U/mg protein	U/mg protein	nmoles/g tissue
Control	7.09±0.16b	3.22±0.11b	0.11±0.00b	0.20±0.01a
Taurine	8.07±0.51ab	4.42±0.14a	0.12±0.01ab	0.19±0.02a
RRW	7.46±0.15ab	3.89±0.16a	0.13±0.01a	0.20±0.02a

Mice were given either vehicle or Taurine (500 mg/kg body weight) or RRW extracts (1 g/kg body weight/day) before exhaustive exercise. The antioxidant activities were measured after dissecting. Data express the mean ± S.E. of 6 mice in each group. * Significantly different from control, p<0.05

[0106] 4.8. Malondialdehyde (MDA)

[0107] 조직액 내의 지질과산화물의 함량은 지질과산화물이 thiobarbitric acid와 반응하여 생성되는 thiobarbitric acid substance (TBARS)를 생성하는 원리를 이용하여 이 thiobarbitric acid substance인 malondialdehyde (MDA)를 표준물질로 하여 그 함량을 평가하였다. 10배 희석된 조직액 500 uL에 15% TCA 250 uL를 첨가하여 10분간 단백질을 침전시킨다. 4, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 500 uL를 새 1.5 mL 튜브로 옮긴 후 0.375% TBA를 500 uL 첨가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 100℃에서 30분간 끓이고, ice 상에서 10분간 cooling 하였다. 4℃, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 만을 535 nm에서 흡광도 측정하였다. TBARS는 MDA 표준곡선을 이용하여 계산하였고 mM/mg protein 또는 nM/mg protein 으로 나타내었다.

[0108] MDA는 지질과산화물질인 MDA의 함량을 측정함으로써 조직 내의 지질과산화 정도를 판단하는 지표이다. 지질과산화는 체내 산화적 손상으로 인한 자유라디칼 생성의 증가 및 항산화 방어 능력의 감소로 인해 일어난다. 지질과산화 정도는 thibarbituric acid와 결합하는 지질과산화물을 MDA의 양으로 비색정량하는 방법을 이용하여 측정하였다. 각 군의 근육 조직의 MDA 함량은 도 4에 나타내었다. 근육조직에서 MDA 함량이 각각 14.13, 7.47, 7.13 nmole/mg protein 이었고 control 군에 비하여 taurine과 RRW 군의 함량이 유의적으로 약 1.9배, 2.0배 감소하였다. 근육에서 MDA 함량을 평가한 결과 Taurine, RRW 군이 지질과산화를 억제하는 것으로 확인되었다.

[0109] **실험예 5. 스트레스 혈중 호르몬 cortisol 함량 평가**

[0110] 상기 실시예에서 얻은 해당화 추출물의 분자수준의 항스트레스 기작을 규명하기 위하여 스트레스 혈중 호르몬

cortisol 함량에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Qiumei Youa., et, al., Toxicology and Applied Pharmacol., 230(1), 1-8, 2008).

[0111] 해부시 얻은 혈액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청만을 분리시켜 70℃에 보관하였다. 분석시 해동된 혈청을 증류수로 10배 희석하여 cortisol standard solution과 함께 coated microplate에 25 uL를 분주한 뒤, 1 X의 cortisol enzyme conjugate를 각 well에 100 uL 분주하고 실온에서 1시간 동안 incubating 하였다. 그 후 well에 남아있는 물질을 제거하고 washing buffer로 3번 세척하였다. 세척 후 TMB substrate를 각 well에 100 uL씩 분주하고, 15분간 incubating 하였다. 50 uL의 stop solution을 분주하여 반응을 멈추고 20분 이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하여 kit (Calbio tec)에 제공된 solution을 반응시켜 얻은 standard curve에 이를 대입하여 ng/mL값으로 계산하였다.

[0112] 양성대조군과 추출물 투여군을 대상으로 스트레스의 지표인 cortisol의 함량을 혈청을 통하여 분석한 결과는 도 5에 나타내었다. 값은 control 군부터 520.8, 358.1, 332.2 ng/mL 이었다. control 군에 비하여 taurine과 RRW 군의 cortisol의 함량이 유의적으로 1.6배, 1.5배 감소하였다. 혈청에서 cortisol 함량을 평가한 결과 taurine, RRW 군이 스트레스로 인하여 분비되는 cortisol 함량이 낮아졌다.

[0113] 결론적으로 해당화 추출물은 지구적 운동 효능에 대하여 효과를 나타내고 한계유형 운동 스트레스로 인하여 유도되는 산화적 스트레스를 억제하는 효과가 있고 즉, 육체적 스트레스 억제에 효과가 있는 기능성 소재로써 판단되며, 향후 대사적 기작관련 연구를 추가 수행하여 기능성 소재로써 매우 유용하게 이용될 수 있다.

[0114] 하기에 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0115] **제제예 1. 산제의 제조**

[0116] RRW ----- 200 mg

[0117] 유당 ----- 100 mg

[0118] 탈크 ----- 10 mg

[0119] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0120] **제제예 2. 정제의 제조**

[0121] RRW ----- 200 mg

[0122] 옥수수전분 ----- 100 mg

[0123] 유당 ----- 100 mg

[0124] 스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg

[0125] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0126] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

[0127] RR20 ----- 200 mg

[0128] 결정성 셀룰로오스 ----- 3 mg

[0129] 락토오스 ----- 14.8 mg

- [0130] 마그네슘 스테아레이트 ----- 0.2 mg
- [0131] 통상의 캡셀제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡셀제를 제조한다.

[0132] **제제예 4. 주사제의 제조**

- [0133] RR80 ----- 200 mg
- [0134] 만니톨 ----- 180 mg
- [0135] 주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg
- [0136] Na₂HPO₄·12H₂O ----- 26 mg
- [0137] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0138] **제제예 5. 액제의 제조**

- [0139] RRW ----- 200 mg
- [0140] 이성화당 ----- 10 g
- [0141] 만니톨 ----- 5 g
- [0142] 정제수 ----- 적량
- [0143] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0144] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

- [0145] RR20 ----- 1000 mg
- [0146] 비타민 혼합물 ----- 적량
- [0147] 비타민 A 아세테이트 ----- 70 μg
- [0148] 비타민 E ----- 1.0 mg
- [0149] 비타민 B1 ----- 0.13 mg
- [0150] 비타민 B2 ----- 0.15 mg
- [0151] 비타민 B6 ----- 0.5 mg
- [0152] 비타민 B12 ----- 0.2 μg
- [0153] 비타민 C ----- 10 mg
- [0154] 비오틴 ----- 10 μg
- [0155] 니코틴산아미드 ----- 1.7 mg
- [0156] 엽산 ----- 50 μg
- [0157] 판토텐산 칼슘 ----- 0.5 mg
- [0158] 무기질 혼합물 ----- 적량
- [0159] 황산제1철 ----- 1.75 mg
- [0160] 산화아연 ----- 0.82 mg

- [0161] 탄산마그네슘 ----- 25.3 mg
- [0162] 제1인산칼륨 ----- 15 mg
- [0163] 제2인산칼슘 ----- 55 mg
- [0164] 구연산칼륨 ----- 90 mg
- [0165] 탄산칼슘 ----- 100 mg
- [0166] 염화마그네슘 ----- 24.8 mg

[0167] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0168] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

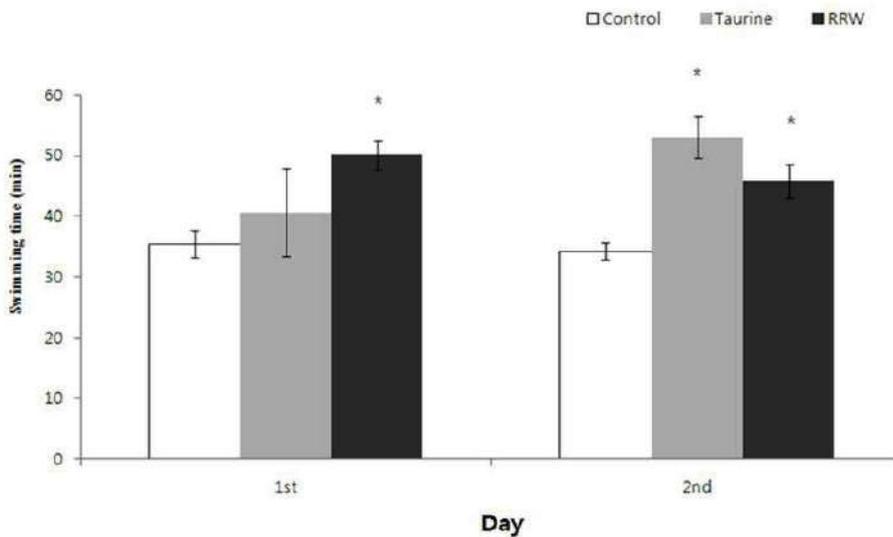
- [0169] RR80 ----- 1000 mg
- [0170] 구연산 ----- 1000 mg
- [0171] 올리고당 ----- 100 g
- [0172] 해당화농축액 ----- 2 g
- [0173] 타우린 ----- 1 g
- [0174] 정제수를 가하여 ----- 전체 900 ml

[0175] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

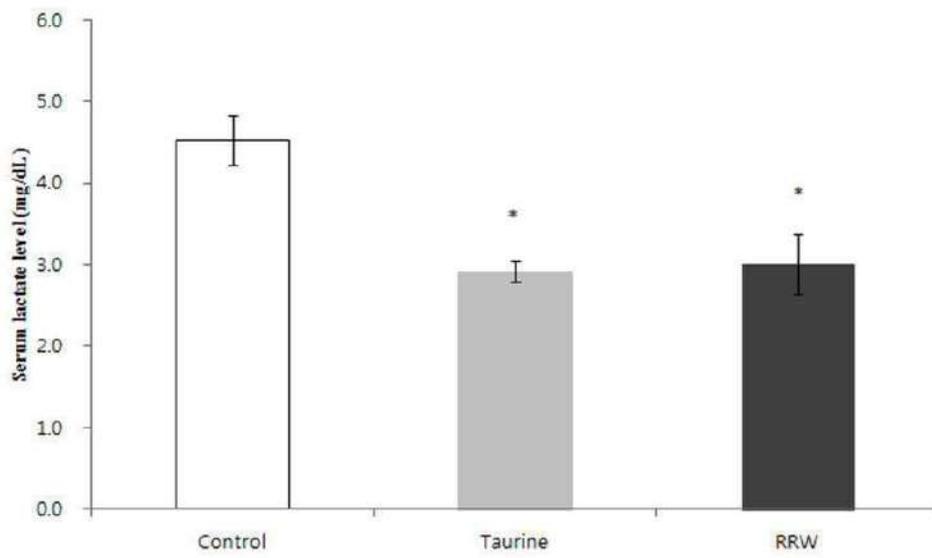
[0176] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

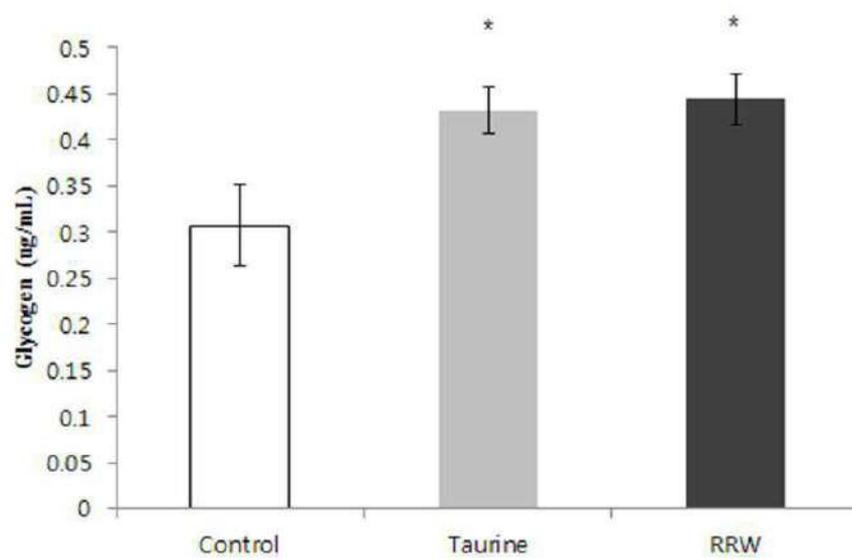
도면1



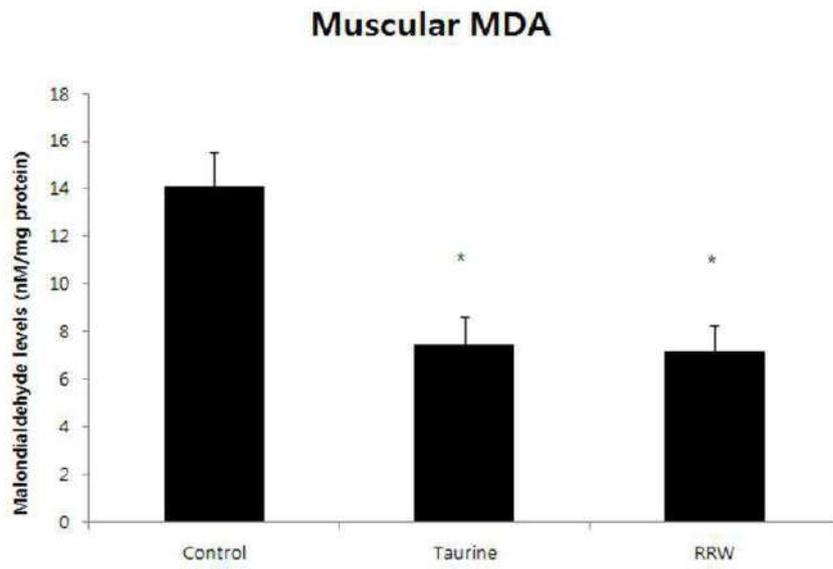
도면2



도면3



도면4



도면5

