



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월24일
(11) 등록번호 10-2126635
(24) 등록일자 2020년06월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7048 (2006.01) A61K 36/535 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7048 (2013.01)
A61K 36/535 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0115142(분할)
- (22) 출원일자 2019년09월19일
심사청구일자 2019년09월19일
- (65) 공개번호 10-2020-0010143
- (43) 공개일자 2020년01월30일
- (62) 원출원 특허 10-2018-0083438
원출원일자 2018년07월18일
심사청구일자 2018년07월18일
- (56) 선행기술조사문헌
CN103933058 A*
Molecules, 14, 133-140, 2009.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
- (72) 발명자
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 10, 105-203
김재용
전라남도 순천시 왕궁길 60, 304-207
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최석진

전체 청구항 수 : 총 6 항

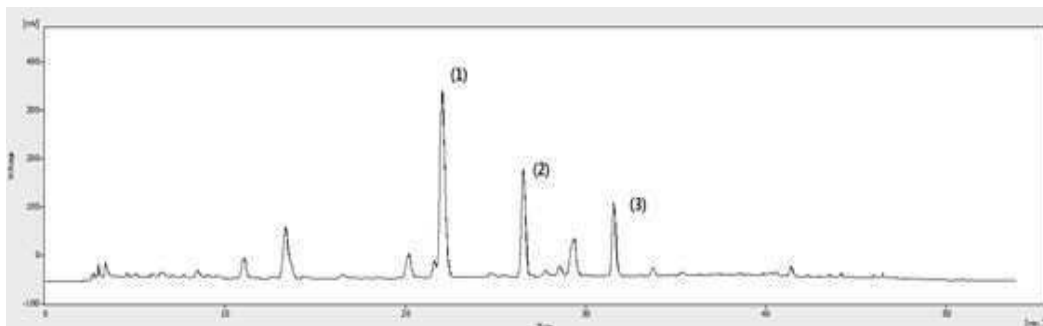
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 차즈기잎 추출물로부터 분리한 luteolin-7-O-diglucuronide 또는 apigenin-7-O-diglucuronide을 유효성분으로 포함하는 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물

(57) 요약

차즈기 추출물에 함유되어 있는 luteolin-7-O-diglucuronide 또는 apigenin-7-O-diglucuronide 화합물의 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 차즈기잎 동결건조물 및 분무건조물의 유효성분은 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 화합물이 동등하게 함유되어 있는 것을 확인하였다. 랫트 눈으로부터 분리한 모양근체 세포(rCSMCs)에서 눈의 이완과 관련 있는 NO, cGMP 함량을 증가시켰으며, [Ca²⁺]_i 이온을 함량을 감소시켰다. 또한 동물실험을 통해 cGMP 함량을 증가시켰다. 이들 화합물들은 랫트 눈으로부터 분리한 모양근체 세포에서 cGMP 함량을 증가시켜 눈의 피로 예방 및 개선에 유용한 조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/20 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

(72) 발명자

강후원

광주광역시 남구 독립로 70-1, 107-402

조아라

광주광역시 남구 백양로 39번길 7-2, 푸르지오 301호

오들리

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202, 503-203

김유진

전라남도 장흥군 장흥읍 건산리 동교1길 16, 302호

임소정

광주광역시 서구 화개1로78번길 8, 505-303

이슬기

전라남도 순천시 이수로 224-29, 102-811

이규옥

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136, 101-404

박성윤

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 215, 606-705

유근창

광주광역시 북구 금호로86번길 30, 105-203

성락선

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39, 203호

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

차즈기잎 추출물로부터 얻어지는 luteolin-7-O-diglucuronide 또는 apigenin-7-O-diglucuronide 화합물을 유효 성분으로 포함하는 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 차즈기잎 추출물을 동결건조 또는 분무건조를 통해 분리 및 정제된 것인 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은 차즈기잎 물 추출물로부터 분리 및 정제된 것인 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화합물은 차즈기 잎 추출물을 Diaion HP-20 수지 칼럼에 첨가하여 분리 및 정제된 것인 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화합물은 모양체근 세포의 cGMP 함량을 증가시키는 활성을 갖는 것인 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물

청구항 7

제1항에 있어서, 약학적 조성물은 정제, 캡슐제, 액제 중에서 선택되는 제형으로 이루어지는 것인 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 차즈기잎 추출물로부터 분리된 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 을 유효성분을 포함하는 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 차즈기(蘇葉; *Perilla frutescens* (L.) Britton var. *acuta* (Thunb.) Kudo)는 생물학적 분류로 피자식물문, 쌍떡잎식물강, 꿀풀과에 속하는 1년초 약용식물로서 우리나라와 중국에 분포한다.

[0003] 줄기는 곧추서고 네모지며 전주(全株)에 자색을 띠고 향기가 있고, 잎은 대생하고 넓은 난형으로 끝은 뾰족하고 밑은 둥글거나 다소 쐐기 모양이며 가장자리에 톱니가 있으며, 양면에 털이 있으며 특히 맥 위에 긴 털이 있고 엽병이 길다. 꽃은 8~9월에 연한 자색으로 피고 줄기와 가지 끝, 위쪽의 잎째에 총상화서로 달린다. 꽃받침은 2개로 갈라지고 위쪽 것은 다시 3열, 아래쪽 것은 2열하며 통부의 내외에 털이 있다. 화관은 짧은 통상 순형이고 하순이 상순보다 약간 길며 수술은 2강용예이고 과실은 분과로 둥글며 꽃받침 안에 들어 있다. 본종은 전체에 자색을 띠며 분과는 원형이고 그물무늬가 있다. 잎과 줄기는 약용으로 쓰이고 어린잎과 종자는 식용한다.

[0004] 어린 잎은 들깨잎과 구분이 어려울 정도로 비슷하며, 차즈기에 들어 있는 페릴알데히드로 만든 설탕은 정상 설

탕보다 2,000배 정도 강한 감미료이므로 담배·장·치약 등에 사용한다. 잎이 자줏빛이 아니고 녹색인 것을 청소엽(for. viridis)이라고 한다. 청소엽은 꽃이 흰색이고 향기가 차즈기보다 강하며 약재로 많이 사용한다.

[0005] 한편, 사물을 인지하는 안구는 눈의 가장 안쪽 층에 존재하는, 빛의 수용과 같은 시각 기능에 대한 중요한 역할을 수행하는 막-유사 조직으로 이루어지고, 망막은 10 개의 층, 예를 들어 외부로부터 하기 순서로 형성된 망막 색소 상피층, 신경상피층, 외경계막, 외과립층, 외망상층, 내과립층, 내망상층, 신경절 세포층, 신경 섬유층 및 내경계막으로 분류된다.

[0006] 외부 세계로부터 망막에 조사된 빛은 내경계막층으로부터 망막의 층에 전달되고 신경상피층에 존재하는 광수용체 세포로서 시각 세포 (간상체 세포 및 추상체 세포)에 의해 수신된다. 시각 세포에서, 빛은 신경 신호로 전환되고, 신호는 망막에 존재하는 다양한 신경 세포에 의해 처리되고, 정보는 최종적으로 시신경을 통해 망막의 표면에 존재하는 신경절 세포로부터 대뇌 중심에 전달된다.

[0007] 고도로 발달된 기계 문명 속에서 각종 환경오염, 텔레비전의 과다시청, 개인용 컴퓨터와 전자 오락기의 과다사용 등으로 인해 눈이 쉽게 피로해지고, 야간 운전이나 야간 작업시 암순응 능력이 저하되는 등 시력 저하현상을 나타내고 있다. 이러한 시력저하 현상을 방지하기 위하여 각종 의약품, 자연식품 등을 즐겨 찾고 있으며, 이중 의약품으로는 와일드 블루베리에서 추출한 안토시아노사이드를 주성분으로 한 시력 개선제가 국내외에서 널리 사용되고 있다.

[0008] 본 발명에서는 우리나라의 전통적인 식물자원을 산업화를 활용할 목적으로차즈기 추출물의 동결건조 및 분무건조 분말의 함유되어 있는 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide의 동등성을 확인하였으며, 차즈기일 추출물로부터 분리한 유효성분을 포함하는 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 차즈기와 관련하여 본 발명자들에 의해 출원, 공개된 국내공개특허공보 제10-2013-121324호는 차즈기일 추출물을 유효성분으로 하는 숙취 해소에 작용하는 고부가가치 기능성 건강식품 조성물이 개시되어있다.

(특허문헌 0002) 국내공개특허공보 제10-2008-10030호는 생약재 복분자(Rubus coreanus), 황금(Scutellaria baicalensis) 및 정향(Syzygium aromaticum) 혼합추출물을 함유하는 건강기능식품에 관한 것으로, 콘택트렌즈의 사용, 눈의 피로, VDT 증후군, 안구건조증, 정상적인 노화현상, 갱년기 등에 의해 야기되는 눈의 산화적 손상을 예방함으로 눈의 건강을 유지 기능을 갖는 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

(특허문헌 0003) 국내공개특허공보 제10-2002-62866호는 시력개선에 탁월한 효과가 있어 시력개선용 의약품, 건강보조식품, 식품등의 원료로 이용되는 안토시아노사이드 저중합체(Anthocyanoside Oligomers) 85 w/w%이상 함유추출물의 제조방법 및 그를 함유한 조성물이 개시되어 있다.

(특허문헌 0004) 국내공개특허공보 제10-1997-6124호는 와일드 블루베리 엑기스 건조분말에 결명자, 구기자, 차전자, 피각, 상삼자, 진자, 동규자, 창출 또는 영양각에서 선택된 1종 또는 2종 이상의 생약재 엑기스 건조분말을 혼합하여 주성분으로 함유하는 시력개선효과를 갖는 건강영양 조성물이 개시되어있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 우리나라 천연자원인 차즈기일 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 눈피로 개선용 약학적 조성물 및 건강 기능성식품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해 본 발명은 차즈기 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물을 제공한다. 차즈기일 추출물로부터 분리한 화합물은

luteolin-7-O-diglucuronide 또는 apigenin-7-O-diglucuronide로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 플라보노이드 배당체 화합물인 것을 특징으로 하며, 차즈기잎 추출물은 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 또는 이들의 혼합용매 중 어느 하나에서 가용한 추출물을 포함한다.

[0012] 상기 추출물은 diaion HP-20 resin을 실시하여 차즈기잎 분획물을 제조하는 것으로 제조된 분획물을 preparative HPLC로 분리하여 NMR, MS로 구조를 동정하는 과정으로 이루어지는 플라보노이드 배당체 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0013] 상기 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이트상, 시럽 등 눈피로 개선 효과를 갖는 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물로 사용된다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 차즈기잎 추출물로부터 분리한 화합물, 특히 luteolin-7-O-diglucuronide 또는 apigenin-7-O-diglucuronide을 유효성분으로 함유하는 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물은 랫트의 눈으로부터 분리한 모양근체평활근세포의 이완과 관련된 NO, cGMP 함량 증가 및 $[Ca^{2+}]_i$ 함량 감소, 동물실험을 통해 모양근체 평활근 이완과 관련 인자인 cGMP을 증가시켜 눈피로 개선에 효과가 있음을 확인하였다. 이로부터 차즈기로부터 추출되는 luteolin-7-O-diglucuronide 또는 apigenin-7-O-diglucuronide 화합물은 국내 천연자원으로서 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선 효과를 갖는 유용한 약학적 조성물 및 건강 기능성식품 조성물로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 HPLC 분석을 통한 차즈기잎 추출물에 함유되어 있는 화합물을 나타낸 그림이다. (1)은 luteolin-7-O-diglucuronide, (2)는 apigenin-7-O-diglucuronide, (3)은 rosmarinic acid를 나타낸다.

도 2은 C_2C_{12} 세포를 이용한 차즈기잎 추출물의 ROS 생성 억제 효과를 나타낸 그림이다. A: MTT assay(세포 독성) B: ROS 측정

도 3은 토끼로부터 분리한 모양근에서 차즈기잎 추출물의 이완 효과를 나타낸 그림이다.

도 4은 대동맥 평활근(hASMCs)에서의 차즈기잎 추출물의 cGMP 및 cAMP 함량 변화를 나타낸 그림이다. A: 15, 30 및 60분 동안 cGMP 함량 B: 15, 30 및 60분 동안 cAMP 함량

도 5은 대동맥 평활근(hASMCs)에서의 차즈기잎 추출물의 PDE5A 및 PDE3A 활성 억제 효과를 나타낸 그림이다. A: PDE5A 활성 B: PDE3A 활성

도 6은 대동맥 평활근(hASMCs)에서의 차즈기잎 추출물의 $[Ca^{2+}]_i$ 농도 변화를 나타낸 그림이다.

도 7은 대동맥 평활근(hASMCs)에서의 차즈기잎 추출물의 ET-1에 의해 유도된 $[Ca^{2+}]_i$ 함량 억제 효과를 나타낸 그림이다.

도 8은 차즈기잎 추출물로부터 분리한 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 화합물 분리 모식도를 나타낸다.

도 9는 차즈기잎 추출물에서 분리한 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 성분 결과를 나타낸다. (A-1) luteolin-7-O-diglucuronide의 화합물 구조, (A-2) luteolin-7-O-diglucuronide의 HPLC 분석. (A-3) luteolin-7-O-diglucuronide의 UV spectrum, (B-1) apigenin-7-O-diglucuronide의 화합물 구조. (B-2) apigenin-7-O-diglucuronide의 HPLC 분석. (B-3) apigenin-7-O-diglucuronide의 UV spectrum.

도 10은 차즈기잎 열수 추출물의 동결건조 및 분무건조 방법에 따른 luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-O-diglucuronide 화합물의 동등성을 나타낸다. FD; freeze-dried, 동결건조, SD; spray-dried, 분무건조

도 11은 차즈기잎 추출물의 SD 랫트의 눈으로 부터 분리한 모양근체 세포에 대한 세포 독성 및 nitric oxide(NO) 생성 효과를 나타낸 그림이다. 차즈기 추출물의 동결건조물의 세포독성 (A) 및 NO 함량 (B)

도 12는 차즈기잎 추출물의 SD 랫트의 눈으로 부터 분리한 모양근체 세포에 대한 cGMP 및 cAMP 함량 변화량을

나타낸 그림이다. 차즈기잎 추출물의 동결건조물의 cGMP (A) 및 cAMP (B) 변화량이다.

도 13은 차즈기잎 추출물의 SD 랫트의 눈으로 부터 분리한 모양근체 세포에 대한 $[Ca^{2+}]_i$ 농도 변화량을 나타낸 그림이다. (A) 차즈기 추출물의 동결건조물이 SD rat부터 분리한 모양체근 세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 함량을 미치는 영향, (B) 차즈기 추출물의 동결건조물이 SD rat부터 분리한 모양체근 세포의 $[Ca^{2+}]_i$ 함량 변화량

도 14는 랫트 눈에 빛을 조사하여 피로를 유발한 후 차즈기잎 추출물 100, 200 mg/kg을 3일 동안 경구투여한 후 랫트 눈의 cGMP 함량 변화를 측정한 그림이다.

도 15은 차즈기잎 추출물로부터 분리한 화합물에 대한 SD 랫트의 눈으로부터 분리한 모양근체 세포에 대한 cGMP 함량 변화량을 cGMP 함량 변화량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 VDT(Visual Display Terminal) 증후군의 안증상 개선용 약학적 조성물은 차즈기잎 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유한다. 이하의 본 발명의 실시예에서는 차즈기잎 추출물로부터 분리된 화합물로서, luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 화합물을 예로 들어 설명한다. 산업화를 최적하기 위하여 건조방법에 따른 차즈기 추출물의 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 함량 변화 차이를 확인하였다.

[0017] 상기 플라노이드 화합물은 눈의 모양체근의 이완 인자인 cGMP 함량을 증가시켜 수축된 모양체근을 이완하여 눈의 피로를 개선한 결과를 확인하였다.

[0018] 본 발명에서, 상기 플라노이드배당체 화합물은 하기 화학식 1로 표시 되는 luteolin-7-O-diglucuronide, 하기 화학식 2로 표시하는 apigenin-7-O-diglucuronide로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이다.

[0020] 실시예 1. 대동맥 평활근 세포(*in vitro*) 및 토끼 눈의 모양체근(*ex vivo*), 조절근점(인체적용시험)에서의 차즈기 추출물의 눈피로 효과

1. 차즈기잎 열수 추출 제조

[0023] 차즈기잎(건잎) 3kg을 10배 증류수를 이용하여 100℃에서 3시간 동안 열수 추출하였다. 상기 추출된 물 추출물을 감압 농축 및 동결 건조하여 차즈기잎 열수 동결건조물 650g을 얻었다.

2. HPLC를 이용한 차즈기 추출물의 성분 분석

[0026] 차즈기잎 열수추출물의 성분분석에 사용된 HPLC 장치는 YL 9100 HPLC system 이며, 칼럼은 Triart C18 plus (250 x 4.6 mm, 5 μm, YNC co. Ltd)를 사용하였다. 이동상은 메탄올(이동상 A) 과 HPLC용 증류수(이동상 B, 0.1% formic acid)이며, 메탄올의 비율을 30%(0~10분)에서 30~50% (10~30분), 60%(35~40분), 60~70%(40~45분), 70~100%(45~53분), 100%(53~56분) 그리고 마지막으로 30%(56~60분)로 조절하였고, 유속은 1mL/min, UV/VIS(9120) 검출기를 이용하여 325 nm에서 분석하였다.

[0027] 도 1은 HPLC 분석을 통한 차즈기잎 추출물의 함유되어 있는 화합물을 나타낸다. 차즈기잎 열수추출물을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 주요 물질인 rosmarinic acid, luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 화합물들이 함유되어 있는 것을 확인 하였다. 도면에 도시된 (1)은 luteolin-7-O-diglucuronide, (2)는 apigenin-7-O-diglucuronide, (3)은 rosmarinic acid를 나타낸다.

3. C₂C₁₂세포를 이용한 ROS 측정

[0030] C₂C₁₂ 세포를 5x10⁵ cells/mL 48 well plate에 분주하였으며, 산화적 스트레스를 유도하기 위하여 과산화수소 (H₂O₂, 200 μM) 2시간 동안 처리 한 후 차즈기 추출물(50, 100, 200 μg/mL)을 24시간동안 반응시켰다. 세포 독성은 MTT 방법을 통하여 측정하였다. ROS 측정을 하기 위하여 배지를 제거하여 PBS로 두 번 세척한 후 1% Triton X-100 (PBS)을 처리하여 37℃에서 10분 동안 세포를 lysis 시켰다. DCF-DA (10 μM) 암실 실온에서 30 분 동안 반응하였다. 반응 후 세포를 차가운 PBS로 두 번 세척하였으며, fluorescence spectrometer을 이용해 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다.

[0031] 도 2은 C₂C₁₂세포를 이용한 차즈기잎 추출물의 ROS 생성 억제 효과를 나타낸다. A는 MTT assay(세포 독성)결과를

나타내고 B는 ROS 측정 결과를 나타낸다. 차즈기잎 추출물 (50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$)은 C_2C_{12} 세포의 독성 없이 H_2O_2 에 의해 유도된 산화스트레스 물질인 ROS 생성을 농도 의존적을 억제하는 것을 확인하였다.

[0033] **4. 토끼 눈 모양근체 이완률 측정**

[0034] 실험동물로서 토끼(2.4~2.7 kg)를 구입하고 환경에 적응시켜 본 시험에 사용하였다. 상기 실험동물에게 졸레틸-립몬 혼합물(1:2)을 근육주사를 놓아 전신 마취시키고 안구를 적출하였다. 적출한 안구는 강막 절개하여 안구의 적도부에서 반으로 절단하고, 수정체를 제거한 후 강막으로부터 모양체근을 조심스럽게 분리하였다. 분리한 모양체근을 폭 3 mm x 길이 6 mm 의 샘플로 잘라 표본을 얻었다.

[0035] 모양체근 절편은 산소 95%, 이산화탄소 5%의 혼합가스를 통기시키고 Krebs-Henseleit (CaCl_2 1.5mM, NaCl 118 mM, KCl 4.7 nM, MgSO_4 1.1 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, NaHCO_3 25 mM, glucose 10 mM; pH 7.4) 액에 넣어 실험을 진행하였다. 모양체근의 수축은 장력 트랜스듀서를 사용하여 1g의 부하를 가하여 현수하였다. 90분 동안 모양체근의 절편을 안정화 시켰다. 안정화 시킨 후 carbachol (100 $\mu\text{M/mL}$)을 첨가하여 수축시켰다. 마지막 자극 후 차즈기잎 추출물 (100, 200 $\mu\text{g/mL}$)을 모양체근에 첨가하여 이완율을 확인하였다.

[0036] 도 3은 토끼로부터 분리한 모양체근에서 차즈기잎 추출물의 이완 효과를 나타낸다. 차즈기잎 추출물이 토끼로부터 분리한 모양체근의 이완에 영향을 미치는지 확인하였다. 즉 carbachol (100 $\mu\text{M/ml}$)를 이용하여 토끼의 모양체근을 수축시킨 후 차즈기 추출물을 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 을 첨가하여 이완율 확인하였다. 증류수(control)를 첨가한 군은 수축된 모양체근에 영향을 미치지 않았으며, 반면에 차즈기 추출물 200 $\mu\text{g/mL}$ 은 유의적으로 carbachol에 의해 수축된 모양체근을 이완시켰다.

[0038] **5. 대동맥 평활근 세포를 이용한 이완 메카니즘**

[0039] 5.1. cGMP 및 cAMP 함량 측정

[0040] Primary human aortic smooth muscle cells (hASMCs)은 ATCC (American Type Culture Collection, PCS-100-012, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였으며, vascular smooth muscle cell growth kit가 첨가되어 있는 Vascular cell basal medium으로 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. hASMC를 6well에 5×10^5 cells/well로 분주하고 24 시간 동안 안정화를 시켰다. 안정화를 시킨 후 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 1 mM)를 10분 동안 선 처리한 후 차즈기잎 추출물(50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)을 15, 30, 60분 동안 반응시켰다. 차즈기 추출물의 cGMP 및 cAMP 함량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

[0041] 도 4은 대동맥 평활근 세포에서의 차즈기잎 추출물의 cGMP 및 cAMP 함량 변화를 나타낸다. A는 15, 30 및 60분 동안 cGMP 함량결과이고, B는 15, 30 및 60분 동안 cAMP 함량결과를 나타낸다. 즉 차즈기잎 추출물(50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$)은 농도 의존적으로 모양근체의 이완과 관련 있는 cGMP 함량을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 또한 차즈기잎 추출물의 반응시간별 (15~60분)로 cGMP 함량을 증가시키는 것을 확인하였다. 반면에 차즈기잎 추출물은 cAMP 함량 변화에는 영향을 미치지 않았다.

[0043] 5.2. Phosphodiesterase (PDE) 억제율 측정

[0044] PDE5A 및 PDE3A 활성은 kit (BPS Bioscience, San Diego, CA)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 Reaction mixture (PDE5A 10 ng/ml, PDE3A 20 ng/ml, FAM-Cyclic-3',5'-GMP, FAM-Cyclic-3',5'-AMP 200 nM)를 50 μL 씩 첨가하였으며, 차즈기잎 추출물 (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)을 첨가하였다. Reaction mixture는 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Diluted binding agent (100 μL)를 첨가하고 다시 reaction mixture를 1시간 동안 반응시켰다. 각 시료의 형광 polarization은 excitation 480 nm, emission 528 nm에서 측정하였다.

[0045] 도 5은 대동맥 평활근 세포에서의 차즈기잎 추출물의 PDE5A 및 PDE3A 활성 억제를 나타낸다. A는 PDE5A 활성 결과를, B는 PDE3A 활성결과를 나타낸다. 차즈기잎 추출물 (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$)은 농도 의존적으로 PDE5A 활성을 억제 하였으나, PDE3A 활성 억제에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 즉 차즈기 추출물 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 PDE5A 활성을 각각 $51.23 \pm 0.29, 42.42 \pm 0.13, 36.58 \pm 0.37\%$ 억제율을 나타내었다. 따라서 차즈기 추출물은 cGMP 기전에 의해 평활근의 이완에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

[0047] 5.3 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 함량 측정

[0048] 칼슘이온 민감성 형광물질인 acetoxymethyl-ester form인 fura-2/AM (fura-2/AM ; Molecular probes, Eugene,

OR)을 칼슘이온 표지물질로 사용하였다. 빛을 차단한 상태에서 HEPES buffer에 5 μM fura-2/AM, 0.001% F127 와 세포에 처리하고 실온에서 60분간 반응시킨다. HEPES buffer로 수회 세척한 수 buffer를 5분간 흘려주며 안정화 시킨다. 차즈기 열수 추출물 (50, 100 및 200 μg/mL)을 농도별로 100 초간 순서대로 처리하였다. 같은 방법으로 5분간 세포를 안정시킨 후 차즈기 열수 추출물을 한 농도씩 100초간 처리하였다.

[0049] 또한 세포에 endothelin-1 (ET-1; 10 nM) 처리하여 100초간 자극한 후 차즈기 열수 추출물 (50, 100 및 200 μg/mL) 을 농도별로 100 초간 순서대로 처리하였다. 이때 모든 buffer와 화학물질의 처리는 중력에 의한 관류 장치에 의해 이루어 졌다. 램프에서 나오는 빛은 컴퓨터 제어 휠을 통해 340 nm, 380 nm 파장의 빛이 선택적으로 세포에 노출되었다. 매 2초 간격으로 340 nm, 380 nm에서 사진을 촬영하였으며, 515 nm long-pass filter를 통과하여 들어온 emitter fluorescence light는 Cooled CCD 카메라를 지나 디지털 형광 분석기에 의해 340 nm/380 nm ratio값을 얻었다.

[0050] 도 6은 대동맥 평활근 세포에서의 차즈기 열수 추출물의 $[Ca^{2+}]_i$ 농도 변화를 나타낸다. 즉 차즈기 열수 추출물에 대한 대동맥평활근 세포(rCSMCs)의 즉 차즈기 열수 추출물 (50, 100 및 200 μg/mL)은 농도 의존적으로 모양근체의 수축과 관련 있는 $[Ca^{2+}]_i$ 농도 함량을 농도 의존적으로 감소시켰다.

[0051] 도 7은 차즈기 열수 추출물의 대동맥 평활근 세포에서 ET-1에 의해 유도된 $[Ca^{2+}]_i$ 함량 억제효과를 나타낸다. ET-1 (10 μM)을 hASMCs 세포에 첨가하여 $[Ca^{2+}]_i$ 농도 함량을 증가시킨 후, 차즈기 열수 추출물 50, 100 및 200 μg/ml 첨가하여 $[Ca^{2+}]_i$ 농도 함량을 측정 한 결과, 차즈기 열수 추출물은 $[Ca^{2+}]_i$ 농도를 유의적으로 감소시켰다.

[0053] 실시예 2. SD rat으로부터 분리한 모양근 세포를 통한 차즈기 열수 추출물에 함유되어 있는 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 의 눈피로 효과

[0055] 1. 차즈기 열수 추출물 제조 및 플라노이드배당체 화합물 분리

[0056] 1-1. 차즈기 열수 추출물 제조

[0057] 차즈기 건잎 3kg을 증류수를 이용하여 100℃에서 3시간동안 열수 추출하였다. 상기 추출물 추출물을 감압 농축한 후 동결 건조 및 분무 건조하여 차즈기 열수 동결건조물(650g, 21.6%) 및 분무건조물(669g, 22.4%) 을 얻었다.

[0058] 1-2. Diaion HP-20 resin을 이용한 유효성분의 분리

[0059] 차즈기 열수 추출물로부터 유효성분을 분리하기 위하여 차즈기 열수추출물 2L를 Diaion HP-20 resin 에 첨가하였으며, 물과 메탄올을 30:70, 50:50, 70:30, 0:100 을 비율대로 순차적으로 용리하였다. 최종적으로 아세톤 2L을 용리하여 5개 분획물을 획득하였다. 5개 분획물 중 첫번째 소분획물 (30:70)을 preparative Waters HPLC를 이용하여 compound 1 (150 mg, purity 96.7%), compound 2 (50mg, purity 96.4%)를 획득하였다.

[0060] 도 8은 차즈기 열수 추출물로부터 분리한 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 화합물 분리 모식도를 나타낸다.

[0061] 1-3. NMR을 이용한 구조 동정

[0062] 상기 실시예 1-2에서 얻어진 물질, compound 1 및 compound 2를 NMR 및 MS를 이용하여 각각 luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-O-diglucuronide으로 구조를 동정하였다. 도 9는 차즈기 열수 추출물에서 분리한 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 성분 결과를 나타낸다. (A-1) luteolin-7-O-diglucuronide의 화합물 구조, (A-2) luteolin-7-O-diglucuronide의 HPLC 분석. (A-3) luteolin-7-O-diglucuronide의 UV spectrum, (B-1) apigenin-7-O-diglucuronide의 화합물 구조. (B-2) apigenin-7-O-diglucuronide의 HPLC 분석. (B-3) apigenin-7-O-diglucuronide의 UV spectrum.

[0063] 각각 동정된 luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-O-diglucuronide의 NMR 및 MS의 분석 구조는 다음과 같다.

[0064] 1) luteolin-7-O-diglucuronide의 분석구조

[0065] **Compound 1**, buff powder, ESI-MS: 639 (M+H)⁺. ¹HNMR (500MHz, pyridine-d₅) δ 4.25~4.74(1H, H-1GluA2), 4.38~4.76(1H, d, J=7.2Hz, H-1GluA1), 4.92(1H, d, J=9.5Hz, H-5'''), 5.57(1H, d, J=8Hz, H-1'''), 6.05 (1H, d, J = 7Hz, H-1'''), 6.82 (1H, s, H-3), 7.13 (1H, d, J = 2Hz, H-6), 7.17(1H, d, J = 2Hz, H-8), 7.21 (1H,

d, J = 8.5 Hz, H-5'), 7.43 (1H, dd, J = 2.0, 8.5 Hz, H-6'), 7.85 (1H, d, J = 2 Hz, H-2').

[0066] ¹³CNMR(125MHz,pyridine-d5) δ 72.43(C-4'''),73.16(C-4'''),76.02(C-2'''),76.80(C-5'''),77.40(C-3'''),77.62(C-3'''),78.06(C-5'''),83.89(C-2''),95.61(C-8),100.06(C-1'''),100.64(C-6),103.77(C-3),106.57(C-1'''),106.75(C-10),114.49(C-2'),116.57(C-5'),119.47(C-6'),122.46(C-1'),147.47(C-3'),151.61(C-4'),157.55(C-5),162.46(C-9),163.47(C-7),165.00(C-2),171.79(C-6'''),172.37(C-6'''),182.61(C-4).

[0068] 2) apenin-7-O-diglucuronide의 분석구조

[0069] **Compound 2**, buff powder, ESI-MS: 623 (M+H)⁺. ¹HNMR(500MHz,pyridine-d5) δ 4.25~4.65(1H,H-1GluA2),4.38~4.77(1H,d,J=7.2Hz,H-1GluA1),4.95(1H,d,J=7Hz,H-5''),5.58(1H,d,J=8Hz,H-1'''), 6.08 (1H, d, J = 7Hz, H-1''), 6.81 (1H, s, H-3), 7.13 (1H, d, J = 2Hz, H-6), 7.16(1H, d, J = 2Hz, H-8), 7.20 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 7.29 (1H, dd, J = 2.0, 8.5 Hz, H-6'), 7.80 (1H, d, J = 8.5 Hz,

[0070] ¹³CNMR(125MHz,pyridine-d5):72.46(C-4'''),73.16(C-4'''),76.02(C-2'''),76.83(C-3'''),77.43(C-5'''),77.63(C-3'''),78.06(C-5'''),83.95(C-2''),95.60(C-8),100.06(C-1'''),100.78(C-6),103.69(C-3),106.57(C-10),106.79(C-1'''),116.57(C-3'),116.57(C-5'),121.82(C-1'),128.74(C-2'),128.74(C-6'),157.56(C-5),162.46(C-9),162.52(C-4'),163.58(C-7),164.63(C-2),171.78(C-6'''),172.36(C-6'''),182.64(C-4).

[0072] **2. 차즈기잎 열수 추출 건조방법에 따른 화합물 동등성 비교**

[0073] 차즈기잎 열수추출물의 동결건조물 및 분무건조물의 화합물의 동등성을 HPLC를 통하여 성분분석을 하였다. 사용된 HPLC 장치는 Waters series HPLC system (Waters corporation 34 Maple street Milford, MA)이며, 칼럼은 Triart C18 plus (250 x 4.6 mm, 5 um, YNC co. Ltd)를 사용하였다. 이동상은 메탄올(이동상 A) 과 HPLC용 증류수(이동상 B, 0.1% formic acid)이며, 메탄올의 비율을 30%(0~10분)에서 30~50% (10~30분), 60%(35~40분), 60~70%(40~45분), 70~100%(45~53분), 100%(53~56분) 그리고 마지막으로 30%(56~60분)로 조절하였고, 유속은 1mL/min, photodiode array (2998) 검출기를 이용하여 254 nm에서 분석하였다.

[0074] 도 10은 차즈기잎 열수 추출물의 동결건조 및 분무건조 방법에 따른 luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-diglucuronide 화합물의 동등성을 나타낸다. FD; freeze-dried, 동결건조를 나타내고, SD; spray-dried, 분무건조를 나타낸다.

[0075] 차즈기 3kg을 증류수로 수세한 다음 증류수 30L를 가하고, 전기약탕기로 100℃에서 3시간 동안 가열, 추출하였다. 추출된 용액은 400 메쉬 여과포로 여과한 다음 감압회전농축기로 감압 농축하였다. 농축된 열수추출물 절반은 동결건조기(Freeze dryer)를 이용하여 동결 건조 하였으며, 나머지 열수추출물은 분무건조기(Spray dryer)로 분무건조 하였다. 차즈기잎 열수추출물의 동결건조물과 분무건조물의 luteolin-7-O-diglucuronide 함량은 각각 40.14 mg/g, 41.11 mg/g 이었으며, apigenin-7-O-diglucuronide 함량은 각각 13.04 mg/g, 14.01 mg/g 으로 동등성을 확인 하였다.

[0077] **3. 랫트 눈으로부터 모양체근 분리 및 세포 배양**

[0078] Luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-O-diglucuronide 화합물을 주요성분으로 함유하고 있는 차즈기잎 추출물의 모양체근 세포 실험을 하기 위하여 3~4주령 Sprague-Dawley 랫트의 눈으로부터 모양체근을 분리 하였다. 즉 분리된 눈은 반으로 잘라 corneal portion을 papain 용액이 첨가되어 있는 15 mL 원심 분리관에 넣고 37℃에서 90분 동안 반응시켰다. 세포 부유액은 새로운 15 mL 원심 분리관에 옮겨 실온에서 원심분리를 하였다 (300 xg, 5분). 상등액을 제거한 후, 세포를 즉시 DMEM/F-12(Invitrogen-Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지에서 배양하였다.

[0080] **4. 차즈기잎 추출물의 랫트로부터 분리한 모양근체 세포 생존률 및 NO 측정**

[0081] 랫트 눈으로부터 분리한 모양근체 세포(rSCMCs)를 10% FBS가 포함된 배지를 사용하여 96 well plate에 1 x 10⁴ cells/well로 분주하고 3일 동안 배양하였다. 3일 배양 한 후 luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-O-diglucuronide 화합물을 주요 성분으로 함유하고 있는 차즈기잎 추출물 50, 100 및 200 μg/mL 농도로 첨가하고 37℃ CO₂ incubator에서 24시간 동안 반응 시켰다. 반응 한 후 WST-1 용액을 각 well에 100 μL 씩 첨가하고 37℃에서 반응시킨 후 제조사에서 제시한 방법을 이용하여 450 nm 파장에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

- [0082] 한편 NO 측정은 랫트 눈으로부터 분리한 모양근체 세포(rCSMCs)를 10% FBS가 포함된 배지를 사용하여 96 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고 3일 동안 배양하였다. 3일 배양 한 후 luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-O-diglucuronide 화합물을 주요 성분으로 함유하고 있는 차즈기잎 추출물 50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 첨가하고 37°C CO₂ incubator에서 24시간 동안 반응 시켰다. 상등액에 대한 NO 측정은 Griess 반응을 이용하여 측정하였다.
- [0083] 도 11은 차즈기잎 추출물에 대한 랫트 (SD rat) 눈으로부터 분리한 모양근체 세포(rCSMCs)의 세포 독성 및 NO 함량을 나타낸다. 차즈기 추출물의 동결건조물의 세포독성 (A) 및 NO 함량 (B)이다. 차즈기잎 추출물 50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 은 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO 함량을 증가하였다.
- [0085] **5. 차즈기잎 추출물의 랫트로부터 분리한 모양근체 세포를 통한 cAMP 및 cGMP 함량 측정**
- [0086] 랫트 눈으로부터 분리한 모양근체 세포 (rCSMCs)를 6well에 5×10^5 cells/well로 분주하고 하룻 동안 안정화를 시켰다. 안정화를 시킨 후 3-isobutyl-1-methylxanthine (1 mM)를 10분 동안 선 처리 한 후 차즈기잎 추출물을 15분 동안 반응시켰다. 차즈기 추출물의 cGMP 및 cAMP 함량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.
- [0087] 도 12는 차즈기잎 추출물에 대한 랫트 눈으로부터 분리한 모양근체 세포 (rCSMCs)의 cGMP 및 cAMP 함량 변화를 나타낸다. 차즈기잎 추출물의 동결건조물의 cGMP (A) 및 cAMP (B) 변화량이다. 차즈기잎 추출물의 동결건조물의 cGMP (A) 및 cAMP (B) 변화량이다. 차즈기잎 추출물 (50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$)은 농도 의존적으로 모양근체의 이완과 관련 있는 cGMP 함량을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 반면에 차즈기잎 추출물은 cAMP 함량 변화에는 영향을 미치지 않았다.
- [0089] **6. 차즈기잎 추출물의 랫트로부터 분리한 모양근체 세포를 통한 [Ca²⁺]_i 함량 측정**
- [0090] 칼슘이온 민감성 형광물질인 acetoxymethyl-ester form인 fura-2/AM (fura-2/AM ; Molecular probes, Eugene, OR)을 칼슘이온 표지물질로 사용하였다. 빛을 차단한 상태에서 HEPES buffer에 5 μM fura-2/AM, 0.001% F127와 세포에 처리하고 실온에서 60분간 반응시킨다. HEPES buffer로 수회 세척한 후 buffer를 5분간 흘려주며 안정화 시킨다. 차즈기 잎수 추출물 (50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$)을 농도별로 100 초간 순서대로 처리하였다. 같은 방법으로 5분간 세포를 안정시킨 후 차즈기 잎수 추출물을 한 농도씩 100초간 처리하였다.
- [0091] 이때 모든 buffer와 화학물질의 처리는 중력에 의한 관류 장치에 의해 이루어 졌다. 램프에서 나오는 빛은 컴퓨터 제어 휠을 통해 340 nm, 380 nm 파장의 빛이 선택적으로 세포에 노출되었다. 매 2초 간격으로 340 nm, 380 nm에서 사진을 촬영하였으며, 515 nm long-pass filter를 통과하여 들어온 emitter fluorescence light는 Cooled CCD 카메라를 지나 디지털 형광 분석기에 의해 340 nm/380 nm ratio값을 얻었다.
- [0092] 도 13은 차즈기잎 추출물에 대한 랫트 눈으로부터 분리한 모양근체 세포 (rCSMCs)의 ca²⁺ 농도 변화를 나타낸다. (A) 차즈기 추출물의 동결건조물이 SD rat부터 분리한 모양근체 세포의 [Ca²⁺]_i 함량을 미치는 영향, (B) 차즈기 추출물의 동결건조물이 SD rat부터 분리한 모양근체 세포의[Ca²⁺]_i 함량 변화량이다. 차즈기잎 추출물 (50, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$)은 농도 의존적으로 모양근체의 수축과 관련 있는 [Ca²⁺]_i 농도 함량을 농도 의존적으로 감소시켰다.
- [0094] **7. 차즈기잎 추출물의 동물실험을 통한 cGMP 함량 측정**
- [0095] 실험동물은 체중 180~200 g의 5-6주령 수컷 SD rat (샘타코)를 사용하였다. 전 실험기간 중 고형사료 및 물은 자유롭게 섭취할수 있도록 공급하였으며, 온도 23±3°C, 습도 50±20%, 12시간 명암주기 조건하에서 사육하였다. 실험동물은 사육실에서 1주일간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 모든 실험과정은 IACU 가이드라인 및 (재)전남생물산업진흥원 천연자원연구센터의 실험동물관리와 사용 지침의 규정에 따라 수행하였다.
- [0096] 동물실험군은 증류수만 3일 동안 섭취한 후 마지막날 빛을 투여하지 않은 정상군, 3일 동안 증류수만 섭취한 후 마지막날 빛을 15분 동안 조사한 대조군, 빛을 조사하고 3일 동안 차즈기 추출물군 (100, 200 mg/kg)을 섭취한 후 마지막날 빛을 15분 동안 조사한 네 개의 군으로 부류하였으며, 각 군에 5마리씩 동물을 배정하였다. 동물을 희생 한 후 SD rat으로부터 눈의 적출 한 후 즉시 PBS로 세척하였다. 세척한 눈을 균질화 한 후 원심 분리하여 상등액을 취하여 cGMP ELISA kit를 이용하여 그 함량을 측정하였다.
- [0097] 도 14는 랫트 눈에 빛을 조사하여 피로를 유발한 후 차즈기잎 추출물 100, 200 mg/kg을 3일 동안 경구투여한 후

랫트 눈의 cGMP 함량 변화를 측정한 결과이다. 차즈기잎 추출물 (100 및 200 mg/kg)은 200 mg/kg 농도를 섭취한 군에서 빛만 조사한 대조군에 비하여 유의적으로 cGMP 함량을 증가시켜 눈 모양근체 이완에 효과가 있음을 확인하였다.

[0099] **8. 차즈기잎 추출물로부터 분리한 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 화합물의 cGMP 함량 측정**

[0100] 랫트 눈으로부터 분리한 모양근체 세포 (rCSMCs)를 6well에 5×10^5 cells/well로 분주하고 하룻동안 안정화를 시켰다. 안정화를 시킨 후 3-isobutyl-1-methylxanthine (1 mM)를 10분 동안 선처리 한 후 차즈기잎 추출물로부터 분리한 luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-O-diglucuronide 화합물을 0.01, 0.05, 0.1 및 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 15분 동안 반응시켰다. 이들 화합물의 cGMP 함량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

[0101] 도 15는 차즈기잎 추출물에 대한 랫트 눈으로부터 분리한 모양근체 세포 (rCSMCs)의 cGMP 함량 변화를 나타낸다. 차즈기잎 추출물로부터 분리한 luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-O-diglucuronide 화합물은 (0.01, 0.05, 0.1 및 1 $\mu\text{g/mL}$)은 모양근체의 이완과 관련 있는 cGMP 함량을 증가시키는 성분으로 확인하였다. 따라서 차즈기잎 추출물의 함유되어 있는 화합물들 중 luteolin-7-O-diglucuronide 및 apigenin-7-O-diglucuronide 성분들이 눈피로 효과에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

[0103] **실시예 3: 눈 조절의 인체적용시험**

[0104] **1. 인체적용시험 방법**

[0105] 본 연구는 D대학교 부속 한방병원 의료기기 임상시험심사위원회 (IRB 허가번호 : DSGOH-033)의 허가를 받아 임상시험을 진행하였다.

[0106] 피험자는 본 연구의 설명문을 받고 자발적으로 서면 동의한 만 18세 이상에서 만 60세 미만의 성인남녀 총 35명의 지원자를 대상으로 스크리닝 검사를 실시하였다. 선천성 또는 만성질환이 없고 내과 진찰결과 병적 증상이나 소견이 없으며 혈액 검사와 활력징후 검사 결과가 정상범위에 속하고, 등가구면 굴절 이상이 $\geq 3.00\text{D}$ 이상인 사람은 스크리닝 검사를 한 결과 최종 연구대상자로 선정된 사람은 총 30명이었다. 본 연구는 1주일간 차즈기 추출물 및 위약대조군을 섭취하였으며, 마지막 섭취하기 전 2시간 동안 근거리 작업(VDT)을 하였다.

[0108] **2. 조절근점 검사**

[0109] 조절근점은 원거리 굴절 이상을 교정한 상태에서 'Push-up' 방법을 이용하여 40 cm 거리에서 한 눈을 가린 후 근거리 시표의 숫자를 선명하게 주시하도록 한 후 피검사자의 가리지 않은 눈앞으로 가까이 당기면서 최초로 흐리게 보이는 흐릿점 상태의 거리를 측정하였다. 우안과 좌안을 검사한 후 양안을 검사하였으며, 3회 반복 측정한 평균값을 사용하였다.

[0110] 표 1은 차즈기잎 추출물군과 위약군의 섭취 전, 섭취 후의 조절근점 변화량을 나타낸다. 차즈기 열수 추출물군과 위약(placebo)군에서 섭취 전, 섭취 후 시각적 근거리 작업을 2시간동안 실시한 후의 평균 조절근점 변화를 비교한 결과는 다음과 같다. 차즈기 열수 추출물군 우안에서는 섭취 전 8.68 ± 2.98 cm에서 섭취 후 7.83 ± 3.08 cm로 통계적으로 유의하게 조절근점이 감소하였다 ($p < 0.001$). 좌안에서는 섭취 전 8.38 ± 3.13 cm에서 섭취 후 7.67 ± 3.21 cm로 유의하게 조절근점이 감소하였다($p < 0.001$). 양안에서도 섭취 전 7.96 ± 2.97 cm에서 섭취 후 7.27 ± 3.25 cm로 섭취 전과 섭취 후 통계적으로 유의하게 조절근점이 감소하였다 ($p < 0.001$).

[0111] 위약(placebo)군 우안에서는 섭취 전 8.90 ± 2.60 cm에서 섭취 후 9.63 ± 2.40 cm로 통계적으로 유의하게 조절근점이 증가하였다 ($p < 0.001$). 좌안에서는 섭취 전 8.60 ± 2.49 cm에서 섭취 후 9.43 ± 2.42 cm로 유의하게 조절근점이 증가하였고($p < 0.001$), 양안에서도 섭취 전 9.00 ± 2.45 cm에서 섭취 후 9.67 ± 2.48 cm로 섭취 전과 섭취 후 통계적으로 유의하게 조절근점이 증가하였다 ($p < 0.001$).

표 1

[0112] 차즈기잎 추출물군과 위약군의 섭취 전, 섭취 후의 조절근점 변화량

조절근점 (cm)		Before	After	Change	t-test	p-value
A	우안	8.68 ± 2.98	7.83 ± 3.08	-0.85 ± 1.32	t = -3.53	p = 0.00*
	좌안	8.38 ± 3.13	7.67 ± 3.21	-0.71 ± 1.21	t = -3.20	p = 0.00*
	양안	7.96 ± 2.97	7.27 ± 3.25	-0.69 ± 1.46	t = -2.60	p = 0.01*

B	우안	8.90±2.60	9.63±2.40	+0.73±0.79	t = 5.12	p = 0.00*
	좌안	8.60±2.49	9.43±2.42	+0.83±1.12	t = 4.09	p = 0.00*
	양안	9.00±2.45	9.67±2.48	+0.67±0.84	t = 4.33	p = 0.00*

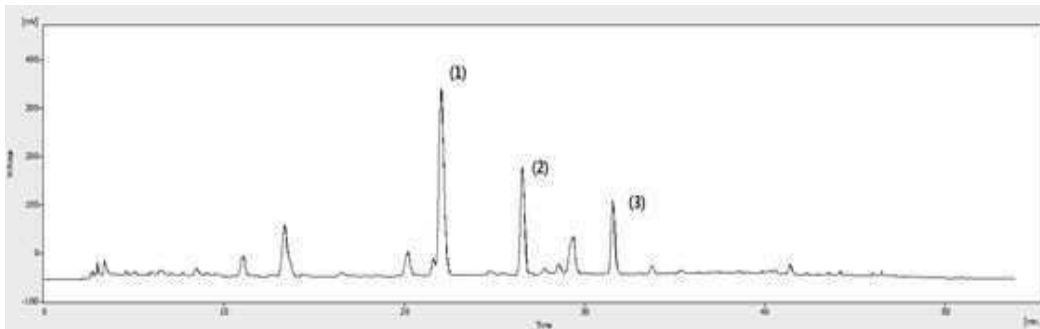
[0113] Unit: cm, *: P<0.05 A: 차즈기 추출물군 B: 위약대조군

산업상 이용가능성

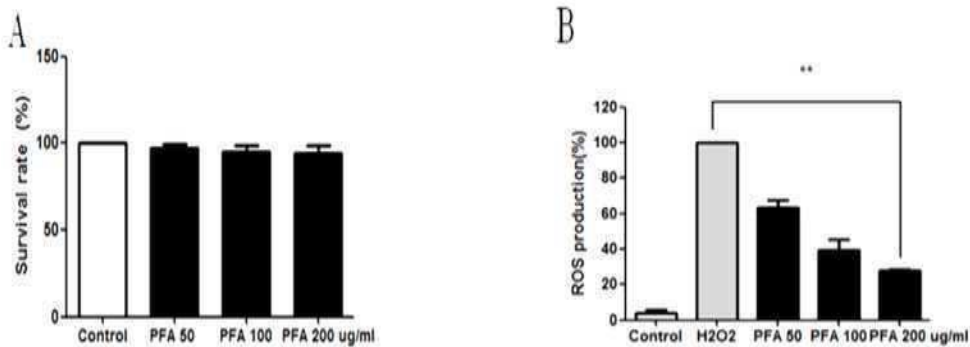
[0114] 우리나라 천연자원인 차즈기잎 추출물에 함유되어 있는 luteolin-7-O-diglucuronide, apigenin-7-O-diglucuronide 화합물을 유효성분으로 사용함으로써 장기간 복용하여도 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 이들 화합물을 포함하는 눈피로 개선에 의한 시력개선 기능을 갖는 개선용 약학적 조성물 및 건강 기능성식품 조성물로서 유용하게 사용될 수 있고 동결건조와 분무건조물의 화합물의 동등성을 확인함으로써 제조생산단계 절감과 산업화를 통한 수입대체 및 농가 소득 증대를 기대할 수 있을 것이다.

도면

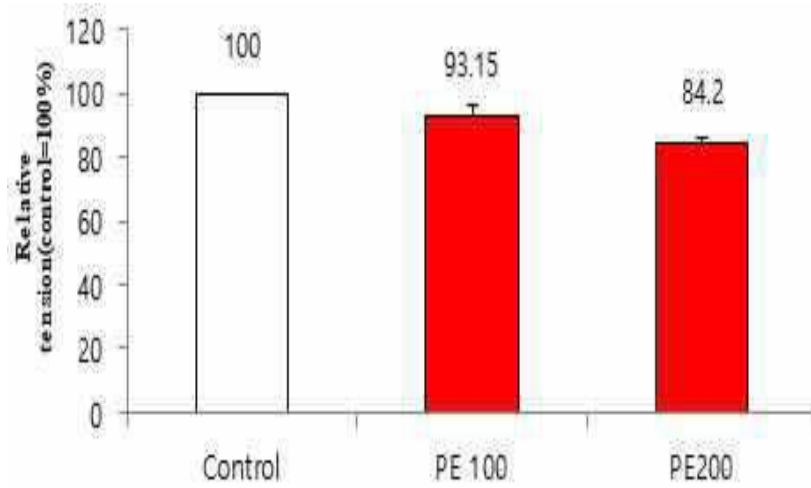
도면1



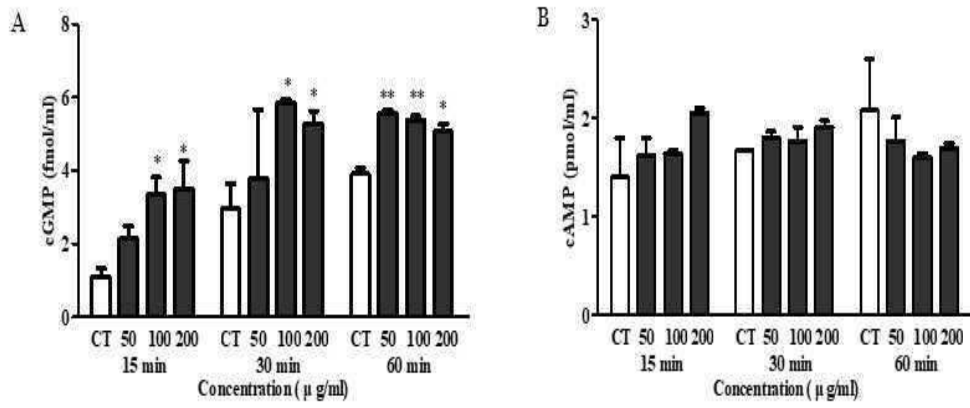
도면2



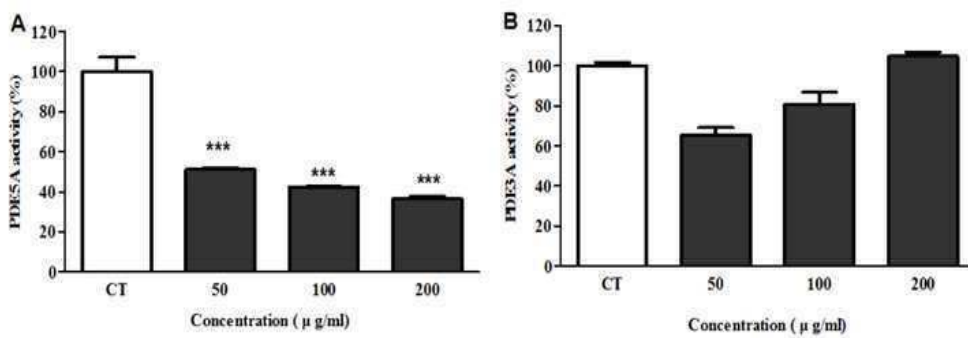
도면3



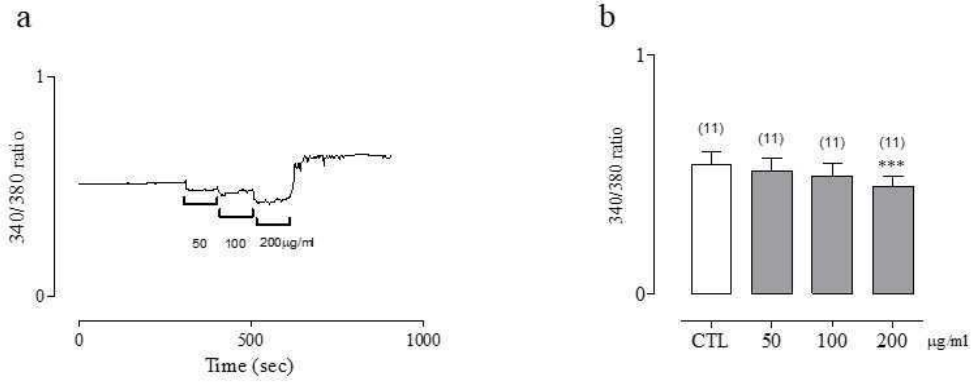
도면4



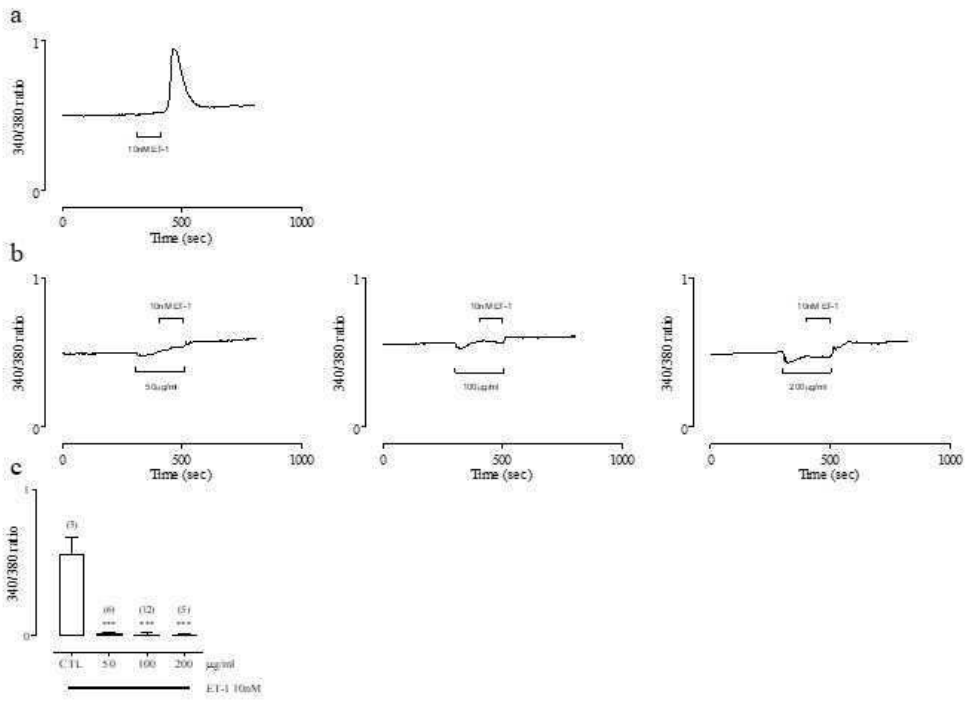
도면5



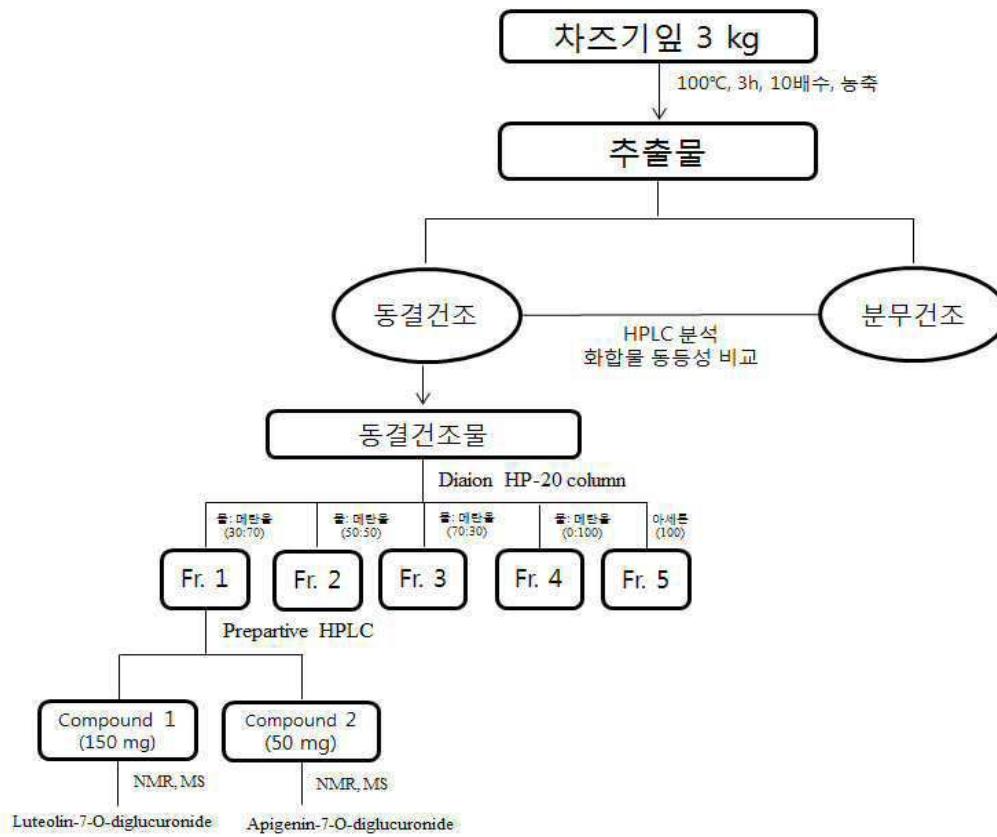
도면6



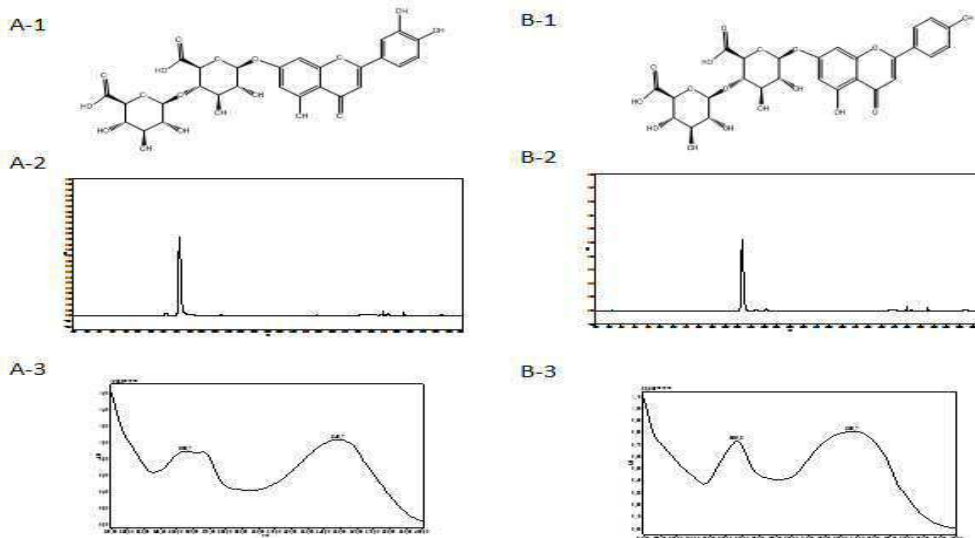
도면7



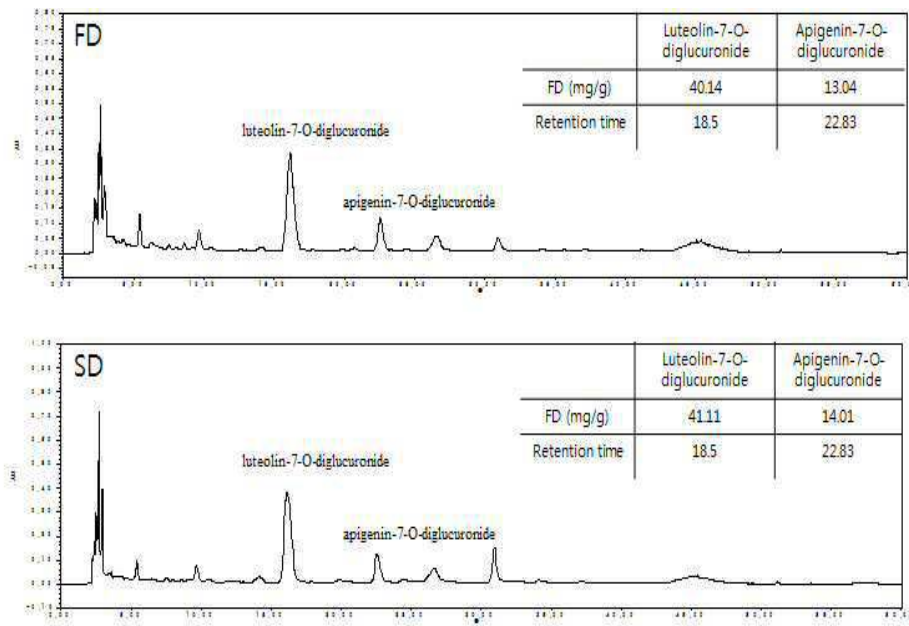
도면8



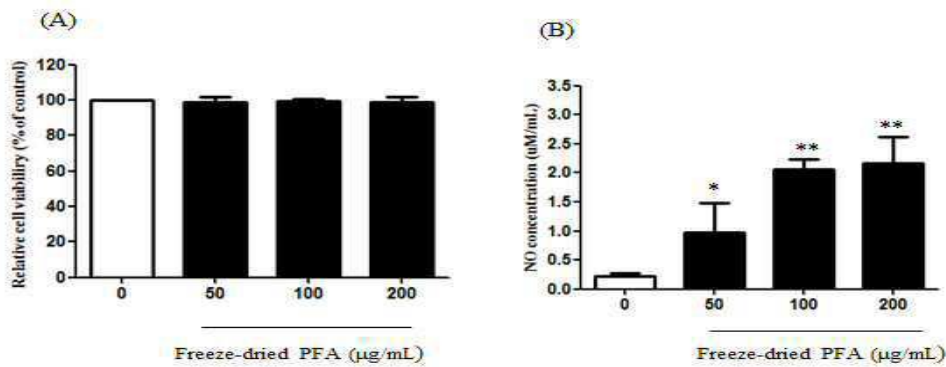
도면9



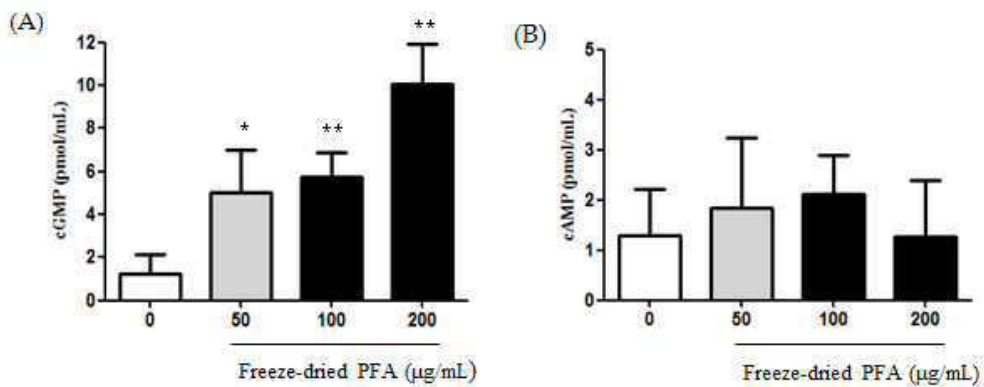
도면10



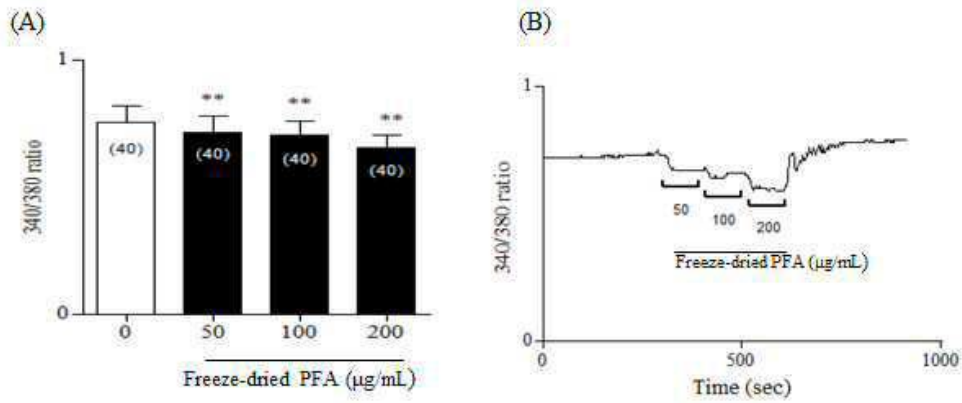
도면11



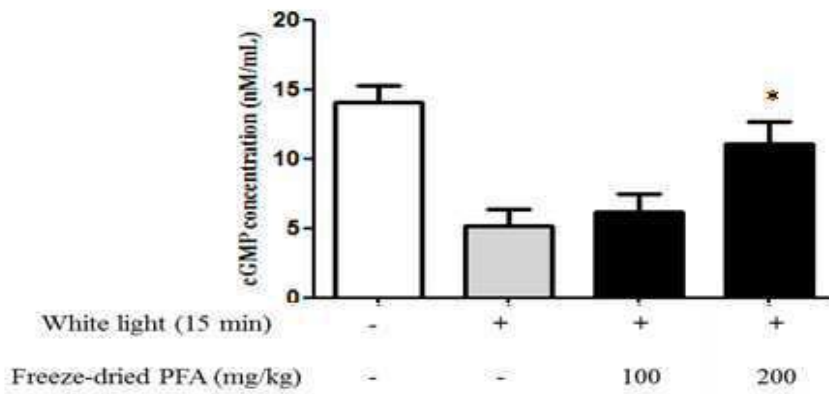
도면12



도면13



도면14



도면15

