



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년02월06일

(11) 등록번호 10-1490030

(24) 등록일자 2015년01월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A24D 3/06** (2006.01) **A24D 3/02** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2013-0077473  
 (22) 출원일자 2013년07월02일  
 심사청구일자 2013년07월10일  
 (65) 공개번호 10-2015-0004235  
 (43) 공개일자 2015년01월12일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020040097112 A  
 KR1019950026418 A  
 KR101283775 B1

(73) 특허권자  
**재단법인 전남생물산업진흥원**  
 전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)  
 (72) 발명자  
**최철웅**  
 광주 서구 풍암순환로 14, 105동 203호 (풍암동, 호반아파트)  
**강후원**  
 전남 나주시 영산포로 205-7, (영산동)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**최석진**

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 김상인

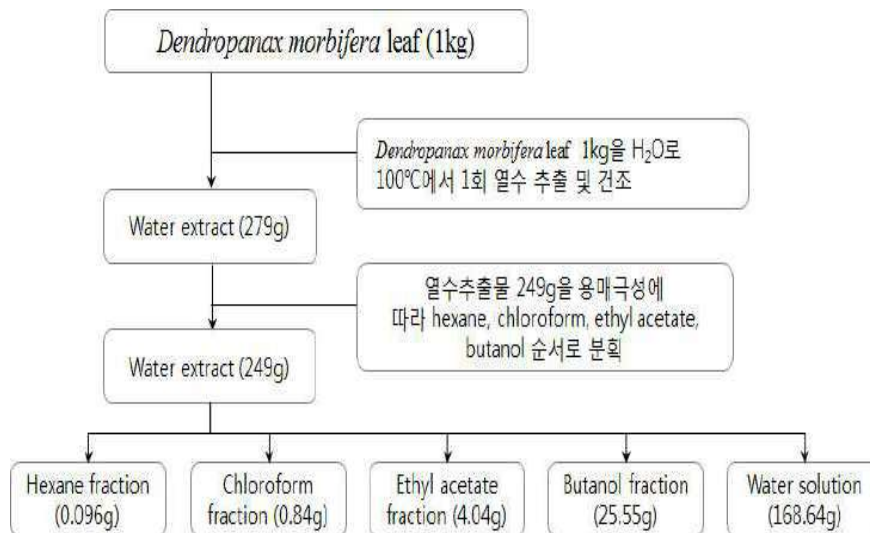
(54) 발명의 명칭 **진해, 거담활성을 갖는 황칠 잎 추출물을 함유한 담배필터 및 그 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중 어느 하나에서 가용하여 추출한 황칠 잎 조추출물에 비극성용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트 중 어느 하나의 비극성가용추출물을 유효성분으로 포함하는 진해 또는 거담제거 활성을 갖는 담배필터 제조방법을 제공한다.

본 발명의 진해 또는 거담용 의약조성물은 천연원료를 이용하여 독성 및 부작용 없으며 진해 또는 거담제거 작용에 뛰어나기 때문에 이를 유효성분으로 함유하는 담배필터 제조에 용이하며, 장기간 복용하여도 부작용이 없어 안전하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**김재용**

전남 순천시 왕궁길 60, 304동 207호 (조례동, 중  
흥3차아파트)

**반상오**

광주 북구 평교로29번길 23, (문흥동)

**이순택**

경기 고양시 일산서구 대산로226번길 24-3, (대  
화동)

**설희진**

광주 남구 봉선2로 96-14, 203동 806호 (봉선동,  
무등2차아파트)

**이규욱**

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136 성은연립  
주택 101동 404호

**장육진**

전남 장흥군 장흥읍 장흥대로 3492, 1005호 (장흥  
계명아파트)

**김희숙**

경남 고성군 개천면 구만로 337-8,

**이동욱**

전남 장흥군 장흥읍 북부로 39, 203호 (수창아트빌  
아파트)

**김선오**

광주 북구 양일로 52, 201동 1003호 (연제동,  
연제2차대주피오레)

**김재갑**

경기 부천시 소사구 경인로134번길 51, 2동 507호  
(송내동, 삼익아파트)

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용하여 추출한 황칠 및 조추출물을 유효성분으로 포함하고 진해, 거담 활성 기능을 갖는 것을 특징으로 하는 담배필터

**청구항 2**

제1항에 있어서, 황칠 및 조추출물은 담배필터에 10 내지 2000mg/체중kg/일의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 담배필터

**청구항 3**

물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용하여 추출한 황칠 및 조추출물 비극성 용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트 중 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획한 분획물을 유효성분으로 포함하며 진해, 거담 활성 기능을 갖는 것을 특징으로 하는 담배필터

**청구항 4**

제3항에 있어서, 분획물은 담배필터에 10 내지 1000mg/체중kg/일의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 담배필터

**청구항 5**

제2항 또는 제4항에 있어서, 담배 필터는 전자담배용 필터, 아세테이트필터, 종이필터, 목탄필터, 탄소필터, 셀룰로오스필터, 차콜 필터 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 담배필터

**청구항 6**

- S1) 황칠나무 잎을 섭씨 40~80도에서 건조하는 단계;
- S2) 황칠나무 잎을 열수추출하는 단계;
- S3) S2) 단계의 열수추출물을 동결건조하여 농축된 열수추출물을 얻는 단계;
- S4) S3) 단계의 황칠나무 잎 열수추출물 분말을 5~15%농도로 물에 희석시켜 희석액을 담배필터에 20~50ul로 담배필터 종류에 분무하는 단계;를 포함하는 진해, 거담활성 기능을 갖는 것을 특징으로 하는 담배필터 제조방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서, S2)와 S3) 단계는 건조된 황칠나무 잎을 증류수로 수세한 다음 증류수를 가하여, 전기약탕기로 100℃도에서 3시간 가열한 후 동결건조시키는 것을 특징으로 하는 담배필터 제조방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, S4) 단계에 사용되는 담배필터는 분말이 분무된 담배필터를 50~60℃ 오븐에서 1~2시간 동안 건조시키는 단계로 이루어지는 것으로, 전자담배용 필터, 아세테이트필터, 종이필터, 목탄필터, 탄소필터, 셀룰로오스필터, 2중 차콜 필터, 3중 차콜 필터 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 담배필터 제조방법.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 천연물인 황칠 유래 추출물을 유효성분을 사용한 진해, 거담활성을 갖는 황칠 잎 추출물을 함유한 담배필터 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 천연원료인 황칠 잎 열수추출물을 유효성분으로 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있으며, 황칠 잎 열수추출물을 장기간 복용하여도 부작용 없이 기침해소(진해) 또는 가래제거(거담)가 가능한 황칠 추출물을 함유하는 진해, 거담활성을 갖는 황칠 잎 추출물을 함유한 담배필터 및 그 제조방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 황칠나무는 생물학적 분류로 현화식물문, 쌍떡잎식물강, 산형화목, 두릅나무과에 속하는 식물로서, 우리나라 고유의 전통도료로 경제적 가치가 있으며, 완도, 해남 및 보길도 등 전라남도의 서남해안 지역과 제주도의 한라산 일대에 자생하는 상록활엽교목이다.

[0003] 상기 황칠나무는 높이가 15 m에 달하고, 어린 가지는 녹색이며 털이 없다. 상기 황칠나무의 잎은 어긋나고 달걀모양 또는 타원형이며, 꽃은 6월에 연한 황록색으로 피고 양성화이다. 상기 황칠나무의 열매는 타원형으로, 10월에 흑색으로 열린다. 전통 공예인 황칠에 사용되는 상기 황칠나무의 진액은 8월 내지 9월에 채취한다.

[0004] 겨울에도 낙엽이 지지 않는 수종으로 수피에 상처를 주면 황색의 수지액이 나오는데 이것을 황칠(黃漆)이라고 한다. 황칠은 투명한 천연 도료로 삼국시대부터 가구, 가죽, 옷감, 금속, 종이 등에 사용되어 왔으며, 특히 황칠을 한 목공예품은 금빛을 띠면서도 바탕의 나무결을 생생하게 떠오르게 하여 목공예품을 한층 화사하게 하는 장점을 가지고 있어 목공예 분야에 널리 사용되어 왔다.

[0005] 황칠은 도료로서의 작용 이외에도 약리작용이 일부 알려져 있는데, 명나라 이시진이 저술한 본초강목에서 황칠은 변열을 제거하며, 술로 인한 황달과 눈 이 노랗게 되는 증상을 풀어주고, 나병치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0006] 황칠의 성분은 황금색 도막을 형성하는 도료성분인 비휘발성분 66.7%, 방향성분 10.8%, 수분 8.1%, 고형분 14.4%로 구성되어 있다. 방향성분은 주로 세스퀴테르펜류의 β-쿠베벤(cubebene), γ-셀리넨(selinene), δ-카디넨(cadinene)으로 이루어져 있으며 이들 성분이 신경계에 대한 진정작용과 강장작용을 나타낸다고 알려져 있다.

[0007] 또한, 황칠나무 수액을 바르게 되면 머리를 맑게 하고 심신을 편안하게 해주는 효과가 있음은 물론, 은은하고 매혹적인 향기를 품고 있어 여성들의 향수로도 사용되고 있으며, 예로부터 민간에 구전되어 오는 안식향(安息香, pterostyrax hispidum)을 제조하는 데 사용하였으며, 황칠 수액으로 안식향을 만들었던 만큼 황

칠 제품에서 풍기는 향은 독특하다고 알려져 있다.

- [0008] 특히, 항산화, 항균 또는 항암 등의 효과를 갖는 것으로 알려져 황칠에서 특정성분을 분리할 경우 의약품으로 활용할 수 있을 뿐만 아니라 옷칠과 달리 피부 알레르기를 거의 유발하지 않고 취급이 용이하나 황칠을 적당히 2차 가공하여 건강식품으로도 널리 활용할 수 있음을 알 수 있다.
- [0009] 또한 황칠나무 잎을 이용한 산업화를 고려할 때 g당 9만원 내지 10만원에 판매되는 수액에 비해 kg당 12,000원 내지 25,000원 정도 판매되는 황칠나무 잎(생잎 기준)을 사용했을 때 훨씬 더 경제성 더 뛰어난 것을 알 수 있다.
- [0010] 그러나, 황칠 원액의 주성분인 세스퀴테르펜의 일부 물질은 독특한 방향특성을 나타낼 뿐만 아니라 쓴맛을 나타내게 되는데, 이 방향성과 쓴맛의 특성으로 인하여 황칠 원액을 건강식품화 할 경우 오히려 소비자에게 거부감을 줄 수 있고, 진해 또는 거담에 관련한 연구는 전혀 알려져 있지 않다.
- [0011] 이와 같은 문제를 해결하기 위해서 본 발명은 황칠 수액에 비해 경제성이 뛰어난 천연원료인 황칠 잎 열수 추출물을 유효성분으로 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있으며, 황칠 잎 열수 추출물을 장기간 복용하여도 부작용 없이 안전한 황칠 잎 열수 추출물을 함유하는 진해, 거담활성을 갖는 황칠 잎 추출물을 함유한 담배필터 및 그 제조방법을 제공하고자 한다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0012] (특허문헌 0001) 국내 공개특허공보 제10-2011-0091959호에는 전통의 한방이나 민간의학에서도 항암과 암치료에 효과가 좋은 식물로 알려진 옻나무, 황칠나무, 후코이단(다시마 미역 등 해조류), 키토산(게 새우의 껍질), 비단풀, 울금, 주목, 마늘, 삼백초, 하늘타리, 천마, 한련초, 까마중, 돌나물, 뱀딸기, 샷갓나물, 조릿대, 지치, 짚신나물, 석창포 등을 일반 물을 사용하지 않고, 해양생태환경을 파괴하여 생태교란동물로 지정된 강장동물인 해파리의 추출액만을 이용하여 유산균으로 발효시켜 얻어진 발효액을 주원료를 이용하여 정상적인 암세포를 사멸시키는 Apoptosis 유도작용을 이용한 암의 치료와 개선효과를 갖는 건강기능식품 조성물 및 그의 제조방법에 관하여 개시되어있다.
- (특허문헌 0002) 국내 공개특허공보 제10-2011-00801387호에는 황칠나무 추출물만을 사용하거나 또는 황칠나무 추출물에 감국, 측백엽, 상백피, 만형자 및 세신으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상으로부터 얻어진 추출물을 더 포함하는 모발용 조성물 첨가제에 관한 것으로, 효모 숙성 단계를 포함하여 추출하는 경우 추출물의 농도를 높여 염모제를 사용하는 경우, 피부자극 및 피부염을 방지하여 모발 및 두피를 보호하는 효과를 제공하는 황칠나무 추출물을 포함하는 모발용 조성물 첨가제 및 그 제조방법에 관하여 개시되어있다.
- (특허문헌 0003) 국내 공개특허공보 제10-2007-0098529호에는 세균을 살균시키거나 유해성분을 제독시키는 기능이 전혀 없는 기존의 황칠수액에 숯분말, 나노은 분말, 맥반석 분말, 은행나무 분말을 혼합하여 살균 및 제독기능과 방부기능을 가지는 기능성 황칠을 제조하는 살균 및 제독기능을 가지는 기능성 황칠 제조방법에 관하여 개시되어있다.
- (특허문헌 0004) 국내 공개특허공보 특1998-026683호에는 황칠나무에서 수액을 채취하여 제조되는 황금색 천연도료인 황칠 도료용 용제 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 에스테르류, 에테르류 및 케톤류 용제 중에서 선택되는 용제를 단독 또는 혼합하여 용해성, 흐름성, 점도 조절의 주역할을 수행하는 진용제로 사용하고, 진용제의 용해성이나 증발속도조절을 주목적으로 하는 조용제로 알콜류 용제를 사용하며 희석용으로는 탄화수소계 용제를 사용하는 황칠 도료용 용제 조성물에 관하여 개시되어있다.
- (특허문헌 0005) 그러나 이와 같은 선행기술에서는 본 발명에서와 같이 천연원료인 황칠 잎 열수 추출물을 유효성분으로 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있으며, 황칠 잎 열수 추출물을 장기간 복용하여도 부작용 없이 기침해소(진해) 또는 가래제거(거담)가 가능하도록 하기 위한 진해, 거담활성을 갖는 황칠 잎 추출물을 함유한 담배필터 및 그 제조방법과는 차이를 보인다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0013] 본 발명은 진해 또는 거담활성에 유효하게 작용하는 진해, 거담활성을 갖는 황칠 및 추출물을 함유한 담배필터 및 그 제조방법에 관한 것으로, 우리나라 천연자원인 황칠 및 열수 추출물을 유효성분으로 장기간 복용하여도 부작용 없이 안전한 진해 또는 거담해소에 작용하는 담배필터를 제공하고자 한다.

**과제의 해결 수단**

[0014] 상기 과제를 해결하기 위해 본 발명은 황칠 및 추출물 또는 비극성가용추출물을 유효성분으로 포함하는 진해 또는 거담용 담배필터를 제공한다.

[0015] 황칠 및 조추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중 어느 하나에서 가용한 추출물 일 수 있으며, 상기 추출용매를 사용하여 추출한 황칠 및 조추출물에 비극성용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트 중 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획할 수 있다.

[0016] 상기 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중 어느 하나에서 가용한 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 진해 또는 거담용 약학 조성물의 0.01 내지 99.9 중량%의 양으로 포함될 수 있으며, 상기 추출물의 1일당 투여량은 체중 kg당 10 내지 2000mg/kg의 양으로 음용할 수 있다.

[0017] 또한, 황칠 및 조추출물에 비극성용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트 중 어느 하나를 분획용매로 사용한 분획물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 진해 또는 거담용 약학 조성물의 0.01 내지 99.9 중량%의 양으로 포함될 수 있으며, 상기 추출물의 1일당 투여량은 분획물이 체중 kg당 1 내지 1000mg/kg의 양으로 투여할 수 있다.

[0018] 더욱 바람직하게는 분획물로서 황칠 및 열수 추출물의 클로로포름으로 분획한 분획물을 유효성분으로 포함하며, 상기 분획물은 전체 조성물의 0.01 내지 99.9중량%로 포함하며, 상기 진해 또는 거담용 담배필터에 함유되는 황칠 및 열수 추출물의 1일당 투여량은 상기 분획물이 1 내지 1000 mg/kg 체중 포함되는 함량이다.

[0019] 담배 필터는 전자담배용 필터, 아세테이트필터, 종이필터, 목탄필터, 탄소필터 중에서 중에서 선택되는 어느 하나 이상으로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0020] 담배필터는 S1) 황칠나무 잎을 건조하는 단계; S2) 황칠나무 잎을 열수추출 하는 단계; S3) S2) 단계의 열수 추출물을 동결 건조하여 농축된 열수추출물을 얻는 단계; S4) S3) 단계의 황칠나무 잎 열수추출물 분말을 담배필터 종류에 분무하는 단계; 를 포함한다.

[0021] S1) 황칠나무 잎을 섭씨40~80도에서 건조하며,

[0022] S2)와 S3) 단계의 건조된 황칠나무 잎 1kg를 증류수로 수세한 다음 증류수 20L를 가하고, 전기약탕기로 100에서 3시간 가열하여 동결건조시키며,

[0023] S4) 단계에 사용되는 담배필터는 셀룰로오스필터, 2중 차콜 필터, 3중 차콜 필터중에서 선택되는 어느하나인 것이고, 분말은 황칠나무 잎 열수추출물 분말을 5~15%농도로 물에 희석시켜 희석액을 담배필터에 20~50ul로 분무하여 담배필터를 50~60 오븐에서 1~2시간 동안 건조시키는 단계로 이루어질 수 있다.

**발명의 효과**

[0024] 본 발명은 천연물인 황칠 및 열수 추출물을 유효성분으로 담배필터에 사용함으로써 장기간 복용하여도 부작용 없이 기침해소(진해) 또는 가래제거(거담)를 할 수 있으며, 천연물인 황칠 및 열수 추출물의 클로로포름 분획물을 유효성분으로 사용함으로써 장기간 복용하여도 부작용 없이 기침해소(진해) 또는 가래제거(거담)를 할 수 있는 현저한 효과가 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0025] 도 1은 황칠 잎을 나타낸 사진이다.

- 도 2은 황칠 잎 열수 추출물의 추출과 분획 모식도를 나타낸다.
- 도 3는 황칠 잎 열수 추출물에 대한 기도에서의 점액분비량 측정결과를 나타낸다.
- 도 4은 황칠 잎 열수 추출물 및 메탄올 추출물에 대한 기도에서의 점액분비량 측정결과를 나타낸다.
- 도 5는 황칠 잎 열수 추출물의 용매별 분획물에 대한 기도에서의 점액분비량 측정결과를 나타낸다.
- 도 6은 황칠 잎 열수 추출물 및 황칠 열수 추출물의 용매별 분획물의 피부감작실험 동물모델에서의 allergy 결과를 나타낸다.
- 도 7은 황칠 잎 열수 추출물을 함유한 담배필터 모식도이다
- 도 8은 황칠 잎 열수 추출물을 HPLC로 분리한 결과를 나타낸다.
- 도 9는 담배 필터를 메탄올 용매로 포집한 물질을 HPLC로 분리한 결과를 나타낸다.
- 도10은 황칠 잎 열수추출물을 담배필터에 통과시킨후 용매로 포집한 물질을 HPLC로 분리한 결과를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0026] 본 발명은 황칠 잎 조추출물 또는 비극성가용추출물을 유효성분으로 포함하는 진해 또는 거담용 담배필터를 제공한다.
- [0027] 황칠 잎 조추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중 어느 하나에서 가용한 추출물 일 수 있으며, 상기 추출용매를 사용하여 추출한 황칠 잎 조추출물에 비극성용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트 중 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획할 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 추출물은 전체 조성물의 0.01 내지 99.9 중량%의 양으로 포함되어 진해 또는 거담용 필터로서 제공될 수 있고, 상기 추출물의 1일당 투여량은 체중 kg당 10 내지 2000mg/kg의 양으로 음용할 수 있다.
- [0029] 황칠 잎 열수 추출물의 클로로포름으로 분획한 분획물을 유효성분으로 포함하며, 상기 분획물은 전체 조성물의 0.01 내지 99.9중량%로 포함하며, 상기 진해 또는 거담용 담배필터에 포함되는 조성물의 1일당 투여량은 상기 분획물이 1 내지 1000 mg/kg 체중 포함되는 함량이다.
- [0030] 진해 또는 거담용 조성물의 추출방법은 황칠 잎을 증류수로 수세한 다음 증류수와 혼합하여 열수 추출하는 단계; 상기 추출물을 여과한 농축하여 동결건조하는 단계; 상기 단계의 추출물을 분획용매에 용해시켜 분획물을 얻는 감압여과 장치로 여과, 농축하여 동결건조하는 단계를 포함하는 추출방법이 제공된다.
- [0031] 또한, 상기 추출물은 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 담배필터로 사용되며, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 경피제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화된 것인 호흡기 질환의 예방 또는 치료용으로 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [0032] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 하기에서 본 발명을 설명함에 있어서, 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략하였다.
- [0033] **1. 황칠 잎 열수 추출물 및 분획물 제조**
- [0034] 도 2은 황칠 잎 열수 추출물 및 유기용매에 의한 분획물을 얻는 과정을 나타낸다. 건조된 황칠 1kg을 증류수로 수세한 다음 증류수 20L를 가하고, 전기약탕기로 100℃에서 3시간 동안 가열, 추출하였다.
- [0035] 추출된 용액은 400 메쉬 여과포로 여과한 다음 감압회전농축기로 농축하였다. 여과 후 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일 과정으로 2번 더 추출, 여과 및 감압 농축한다. 농축된 열수 추출물을 동결건조기(Freeze dryer)에서 동결건조 하였다. 건조 후 황칠 잎 열수 추출물 279g (24.9%)을 얻었다.
- [0036] **2. 황칠 잎의 극성용매, 비극성용매 가용 분획물의 제조**



- [0037] 도 2에 도시된 바와 같이 제조된 황칠 잎 열수 추출물을 유기 용매를 이용하여 분획물을 제조하였다. 황칠 잎의 극성용매, 비극성용매 가용 분획물의 제조는 황칠 잎 열수 추출물 249g을 증류수 1L에 완전히 용해시킨 후 분획여두 깔대기에 넣고 헥산(Hexane) 1L를 첨가하여 water 층과 hexane 층을 분리하였고 이와 같은 공정을 3번 반복하였다.
- [0038] 동일한 과정을 통해 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol), 물을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻었고, 얻어진 각각의 분획물을 감압여과 장치로 여과하여 농축한 후 동결 건조하여 용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다.
- [0039] 2.1. 헥산 가용성 분획 분리
- [0040] 황칠 잎 열수 추출물 249g을 1L의 증류수에 완전히 용해시킨 후에 분획여두에 넣고 헥산 1L를 첨가하여 헥산 불용성층(수층)과 헥산가용성층을 분리하였다. 다시 헥산 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 헥산 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.
- [0041] 2.2. 클로로포름 가용성 분획분리
- [0042] 헥산불용성 분획(수층)에 클로로포름 5L를 가하여 섞은 후에 클로로포름가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 클로로포름 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 클로로포름 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.
- [0043] 2.3. 에틸아세테이트 가용성 분획분리
- [0044] 클로로포름 불용성 분획(수층)에 에틸아세테이트 5L를 가하여 섞은 후에 에틸아세테이트 가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 에틸아세테이트 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 에틸아세테이트 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.
- [0045] 2.4. 부탄올 가용성 분획분리
- [0046] 에틸아세테이트 불용성 분획(수층)에 부탄올 5L를 가하여 섞은 후에 부탄올 가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 부탄올 불용성층을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 부탄올 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.
- [0047] 2.5. 황칠 잎 열수 추출물 및 분획물 수득
- [0048] 황칠 잎 열수 추출물 249g에서 헥산 가용성 분획, 클로로포름 가용성 분획, 에틸아세테이트 가용성 분획 및 부탄올 가용성 분획을 감압 농축한 후에 동결 건조하여 헥산분획 0.096g (0.04%), 클로로포름 분획 0.57g (0.84%), 에틸아세테이트 분획 4.04g (1.63%), 부탄올 분획 54.74g (10.28%) 및 물 분획 168.64g (67.84%)을 얻어 시료로 사용하였다
- [0049] 3. 실험 동물사육
- [0050] 황칠 추출물의 진해 또는 거담 효과 측정을 위한 실험동물로서 생후 5주령 된 수컷 ICR 마우스 (18-22g) 및 8주령 된 체중  $320 \pm 100g$  내외의 수컷 SD Rat 흰쥐를 (주)샘타코 (SAMTACO, Korea)부터 구입 하여 동물 사육실에서 일정한 조건(온도:  $22 \pm 2^\circ C$ , 습도:  $50 \pm 5\%$ , 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 일주일간 적응시킨 후 사용하였다.
- [0051] 3.1. 페놀레드(phenol red)를 이용한 기도에서의 점액분비량 측정 (황칠 잎 열수 추출물)



- [0052] 황칠 잎 열수 추출물의 거담활성을 측정하기 위하여, 수컷 ICR 마우스를 정상군(normal), 양성대조군(control), 시료 투여군(sample)으로 각각 3군으로 나누었다. 정상군은 살린(saline) 100  $\mu$ L를 경구 투여하였고, 양성대조군은 암모니움클로라이드(NH<sub>4</sub>Cl)를 1000mg/kg 농도로 200  $\mu$ L를 경구 투여하였다.
- [0053] 실험군은 황칠 잎 열수 추출물을 각각 50, 100, 200mg/kg 농도로 100  $\mu$ L를 경구 투여하였으며, 시료는 saline에 녹여 조제하였고, NH<sub>4</sub>Cl은 3차 증류수에 녹여서 조제하였다. 각 군을 경구투여 1시간 경과 후 0.2mL의 페놀레드(phenol red) 10mg/kg을 복강 주사하였다.
- [0054] 각 군의 생쥐는 30분 경과 후 디에틸이더(dimethylether)를 이용하여 마취시키고 복부 대동맥을 절단하여 방혈시킨 후 기관(trachea) 전체를 절제하였다. 분리된 기관을 1mL의 생리식염수에 넣어 30분 간 조직을 세척 및 블텍싱(washing/ vortexing) 한 후 그 세정액을 원심분리(10,000rpm, 5min, 실온)하였다. 분리한 상층액으로부터 0.9mL를 취하여 이 용액에 0.1mL의 1M NaOH를 가하여 발색시켰다. 이 용액을 흡광도 546nm에서 측정하여 기도로부터 추출된 페놀레드를 측정하였다. 이를 적출한 기도의 무게로 나누어 기도에 대한 페놀레드의 비율을 구하여 기도에서의 점액분비량을 구하였다.
- [0055] 페놀레드를 이용한 기도에서의 점액분비량 측정결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 기도 1g당 페놀레드 함량은 정상군에서 2.436  $\mu$ g/g, 양성대조군으로 사용한 NH<sub>4</sub>Cl군에서 3.476  $\mu$ g/g, 실험군인 황칠 잎 열수 추출물을 50, 100, 200mg/kg 투여한 군에서는 각각 2.958 (21.4%), 3.108 (27.6%), 3.105  $\mu$ g/g (27%) 값을 얻었다. 이는 황칠 잎 열수 추출물이 농도 의존적으로 페놀레드 함량 증가 즉, 점액분비량을 증가시킴으로서 객담 배출능이 우수한 활성(거담활성)을 나타냄을 확인 하였다.
- [0056] 3.2. 페놀레드(phenol red)를 이용한 기도에서의 점액분비량 측정 (황칠 잎 열수 추출물과 메탄올 추출물 비교)
- [0057] 황칠 잎 열수 추출물의 진해활성을 측정하기 위하여, 수컷 SD Rat 생쥐를 정상군(normal), 정상대조군(control), 시료 투여군(sample)으로 각각 3군으로 나누었다. 정상군은 살린(saline) 500  $\mu$ L를 경구 투여하였고, 양성대조군은 암모니움클로라이드(NH<sub>4</sub>Cl)을 1000mg/kg 농도로 1ml를 경구 투여하였다.
- [0058] 실험군은 황칠 잎 열수 추출물, 황칠 잎 메탄올 추출물을 각각 200mg/kg농도로 500  $\mu$ L를 경구 투여하였으며, 시료는 saline에 녹여 조제하였고, 양성대조군에서 사용된 NH<sub>4</sub>Cl은 3차 증류수에 녹여서 조제하였다. 각 군을 경구투여 30분 경과 후 0.5mL의 페놀레드(phenol red) 10mg/kg을 복강 주사하였다.
- [0059] 각 군의 흰쥐를 30분 경과 후 디에틸이더(dimethylether)를 이용하여 마취시키고 복부 대동맥을 절단하여 방혈시킨 후 기관(trachea) 전체를 절제하였다. 분리된 기관을 1mL의 생리식염수에 넣어 30분간 조직을 세척 및 블텍싱(washing/vortexing) 한 후 그 세정액을 원심분리(10,000rpm, 5min, 실온)하였다. 분리한 상층액으로부터 0.9mL를 취하여 이 용액에 0.1mL의 1M NaOH를 가하여 발색시켰다. 이 용액을 흡광도 546nm에서 측정하여 기도로부터 추출된 페놀레드를 측정하였다. 이를 적출한 기도의 무게로 나누어 기도에 대한 페놀레드의 비율을 구하여 기도에서의 점액분비량을 구하였다.
- [0060] 페놀레드를 이용한 기도에서의 점액분비량 측정결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 페놀레드 함량은 정상군에서는 2.6  $\mu$ g/g, 양성대조군으로 사용한 NH<sub>4</sub>Cl군에서 3.9  $\mu$ g/g, 실험군인 황칠 잎 열수 추출물 (200mg/kg), 황칠 잎 메탄올 추출물 (200mg/kg) 투여군에서 각각 3.1  $\mu$ g/g (19.2%), 2.2  $\mu$ g/g (효과 없음) 값을 얻었다. 이는 황칠 잎 열수 추출물이 메탄올 추출물 보다 페놀레드 함량 증가 즉, 점액분비량을 증가시킴으로서 객담배출능이 우수한 활성(거담활성)을 나타냄을 재확인 하였다.
- [0061] 3.3. 페놀레드(phenol red)를 이용한 기도에서의 점액분비량 측정 (황칠 잎 열수 추출물의 용매별 분획물 비교)
- [0062] 황칠 잎 열수 추출물의 진해활성을 측정하기 위하여, 수컷 SD Rat 생쥐를 정상군(normal), 정상대조군(control), 시료 투여군(sample)으로 각각 6군으로 나누었다. 정상군은 살린(saline) 500  $\mu$ L를 경구 투여하였고, 양성대조군은 암모니움클로라이드(NH<sub>4</sub>Cl)을 1000 mg/kg 농도로 1ml를 경구 투여하였다.
- [0063] 실험군은 황칠 잎 열수 추출물 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물을 각각 50mg/kg 농도로 500  $\mu$ L를 경구 투여하였으며, 시료는 살린 및 에탄올에 녹여 조제하였고, 양성대조군에서 사용된 NH<sub>4</sub>Cl은 3차 증류수에 녹여서 조제하였다. 각 군을 경구투여 1시간 경과 후 0.5mL의 페놀레드(phenol red) 10mg/kg을 복강 주사하였다.

[0064] 각 군의 흰쥐를 30분 경과 후 디에틸이더(dimethylether)를 이용하여 마취시키고 복부 대동맥을 절단하여 방혈시킨 후 기관 (trachea) 전체를 절제하였다. 분리된 기관을 1ml의 생리식염수에 넣어 30분간 조직을 세척 및 볼텍싱 (washing/ vortexing)한 후 그 세정액을 원심분리(10,000rpm, 5min, 실온)하였다. 분리한 상층액으로부터 0.9ml를 취하여 이 용액에 0.1ml의 1M NaOH를 가하여 발색시켰다. 이 용액을 흡광도 546nm에서 측정하여 기도로부터 추출된 페놀레드를 측정하였다. 이를 적출한 기도의 무게로 나누어 기도에 대한 페놀레드의 비율을 구하여 기도에서의 점액분비량을 구하였다.

[0065] 페놀레드(phenol red)를 이용한 기도에서의 점액분비량 측정결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 페놀레드 함량은 정상군에서는 2.6 µg/g, 양성대조군으로 사용한 NH<sub>4</sub>Cl군에서는 3.9 µg/g, 실험군인 황칠 잎 열수 추출물의 클로로포름 분획물 (50 mg/kg), 황칠 잎 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물 (50mg/kg), 황칠 잎 열수추출물의 부탄올 분획물 (50mg/kg), 황칠 잎 열수 추출물의 물층 분획물 (50mg/kg) 투여군에서는 각각 4.8 µg/g (84.6%), 3.8 µg/g (46.2%), 2.5 µg/g (유의성 없음), 2.6 µg/g (유의성 없음) 값을 얻었다.

[0066] 이 중에서 황칠 잎 열수 추출물의 클로로포름 분획물의 페놀레드 함량 증가가 가장 높게 나타났다. 이는 황칠 잎 열수 추출물의 클로로포름 분획물이 점액분비량을 증가시킴으로서 객담배출능이 가장 우수한 활성(거담활성)을 나타냄을 확인 하였다.

[0067] 3.4 시트르산을 이용한 황칠 잎 열수 추출물의 진해활성 측정

[0068] 황칠 잎 열수 추출물의 진해활성을 측정하기 위하여, 수컷 SD Rat 흰쥐를 대조군(control), 시료 투여군(sample)으로 각각 2군으로 나누었다. 수컷 Rat 흰쥐에 황칠 물 추출물 (200 mg/kg)을 경구투여하고 1시간 후 흰쥐를 플레테시스모그래프 챔버 (Buxco, U.S.A)에 넣어 안정을 유도한 후, 기침 유발제 (시트르산)을 분무하여 기침을 유발하였다. 1 M의 시트르산에 흰쥐를 10분간 노출시키고 이때 발생하는 기침수를 10분 동안 측정하였다.

[0069] 표 1에서 나타낸 바와 같이 황칠 잎 열수 추출물의 진해 활성을 측정한 결과, 시트르산으로 기침을 유발한 대조군에 비해 20.1 % 우수한 진해활성을 확인하였다.

표 1

[0070] 황칠 잎 열수 추출물의 진해 활성 측정결과를 나타낸다.

	투여용량(mg/kg)	기침횟수(회/min)	기침억제율(%)
대조군	-	110.2±17.3	
실험군 (황칠 열수 추출물)	200	88.0±4.7	20.1

[0071] 3.5. 피부감작실험을 통한 황칠 잎 열수 추출물, 분획물의 allergy 실험

[0072] 황칠 잎 열수 추출물 및 분획물의 안전성을 측정하기 위하여 30gauge 인슐린 주사기로 암컷 nude 마우스 등에 황칠 잎 열수 추출물을 10, 50, 70 및 100 mg/mL 농도로 각각 0.02mL 씩 피하 주입하였으며, 황칠 잎 열수 추출물의 용매별 분획물은 각각 50mg/mL 농도로 0.02mL 피하로 주입하였다. 30분 후 황칠 잎 열수 추출물과 황칠 잎 열수 추출물의 용매별 분획물의 allergy 유무를 판단하였다.

[0073] 도 6은 황칠 잎 열수 추출물 및 황칠 열수 추출물의 용매별 분획물의 피부감작실험 동물모델에서의 allergy 결과를 나타낸다. 도 6A에서 나타낸바와 같이, 황칠 잎 열수 추출물을 농도 (10, 50, 70, 100 mg/mL) 별로 처리해서 확인한 결과 50mg/mL 농도 (최종농도 1mg) 이하에서는 알러지 반응이 유발되지 않는 것을 확인하였다(표 2).

표 2

[0074] 황칠 잎 열수 추출물의 농도별 알러지 반응 결과

	황칠 물추출물(mg/mL)			
	10	50	70	100
Allergy 반응	-	-	**	**

[0075] Allergy 반응: -: 없음, \*: 하, \*\*: 중, \*\*\*: 상

[0076] 다음으로 도 6B에서 나타낸 바와 같이 황칠 잎 열수 추출물의 용매별 분획물(50mg/ml)의 경우, 헥산, 클로로포름, 물 분획물에서는 마우스 피부에 알러지 반응이 나타나지 않음을 확인하였다(표 3).

**표 3**

[0077] 황칠 잎 열수 추출물의 용매별 분획물(50mg/ml)의 경우 알러지 반응 결과

	황칠 분획물(50 mg/mL)				
	헥산	클로로포름	에틸아세이트	부탄올	물
Allergy 반응	-	-	**	**	-

[0078] Allergy 반응: -: 없음, \*: 하, \*\*: 중, \*\*\*: 상

[0079] 따라서, 본 발명에서는 황칠 잎 열수 추출물 50mg/mL 농도 (최종농도 1mg), 황칠 잎 열수 추출물의 헥산, 클로로포름, 물 분획물 각각 50mg/mL 농도 (최종농도 1mg)에서 피부에 대한 알러지 반응이 유발되지 않을 정도로 독성이 없이 안정함을 확인하였다. 특히, 클로로포름 분획물은 진해 또는 거담 활성에 안정성이 있는 유효성분이 포함되어 있는 것을 확인하였다.

[0080] 이로부터 본 발명의 진해 또는 거담용 조성물은 천연원료를 이용하여 독성 및 부작용이 없으며 진해 또는 거담 제거 작용에 뛰어나기 때문에 이를 유효성분으로 함유하는 담배필터로서 이용가능하며, 장기간 복용하여도 부작용이 없어 안전하게 사용될 수 있다.

[0081] **4. 담배필터에 황칠나무 잎 열수추출물 물질을 확인하기 위한 비교**

[0082] 셀룰로오스 아세테이트 필터 1에 황칠나무 잎 열수추출물 분말을 12.5% 농도로 물에 희석시킨 희석액을 분무시킨 후 30 오븐에서 10시간 동안 건조시켰다. 건조된 셀룰로오스 아세테이트 필터에 일반적인 셀룰로오스 아세테이트 필터를 양쪽으로 하여 하나의 필터가 되게끔 고정을 하였다. 고정된 필터 길이는 3cm이고 도면 1과 같다. 황칠나무 잎 열수추출물 물질들이 담배필터를 통과했는지 확인하기 위해 상기필터를 일정한 흡입력을 주고 메탄올로 용매포집을 하였고, 비교하기 위하여 담배필터만 일정한 흡입력을 주고 메탄올로 용매포집을 하였고, 황칠나무 잎 열수 추출물을 준비하였다. 3가지 조건의 시료들은 메탄올로 10/로 희석한 후 메탄올 농도기울기법을 이용해 HPLC로 도면 8,9,10과 같이 분리, 확인하였다.

[0083] 실험결과 도면 8에서 알 수 있듯이 황칠 잎 열수 추출물의 HPLC 데이터는 일정한 패턴의 피크를 확인할 수 있었고, 도면 9에서 보는바와 같이, 담배필터만 용매포집한 후 분리한 HPLC 데이터에서는 열수 추출물과 다르게 머무름 시간이 뒷부분인 곳에서 특정한 피크를 확인 할 수 있었다. 또한 도면 10에 보는 바와 같이, 황칠 잎 열수 추출물을 12.5% 농도로 물에 희석시킨 희석액을 분무시킨 후 30 오븐에서 10시간 동안 건조 시킨 후 제조한 담배필터로부터 용매 포집한 시료를 분석한 HPLC 데이터에는 담배필터만 통과 시킨 후 보이는 특정한 피크를 포함하여, 황칠 잎 열수 추출물에서 분리된 물질들이 검출됨을 확인하였고, 이는 황칠 잎 열수 추출물에서 지는 진해 또는 거담활성을 갖는 성분을 함유한 담배 필터를 제조할 수 있음을 확인하였다.

**산업상 이용가능성**

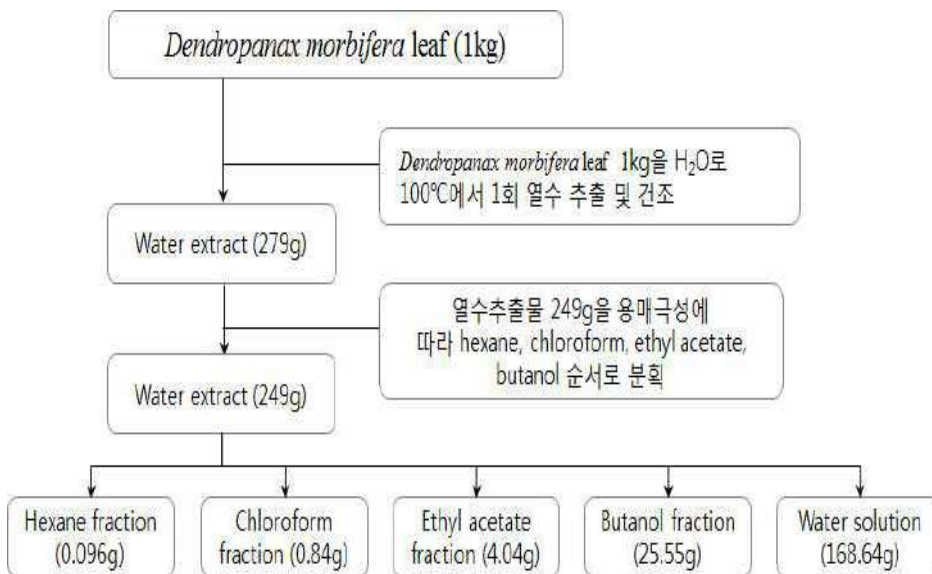
[0084] 진해 또는 거담용 조성물로서 황칠 잎 열수 추출물은 인체에 부작용이 없으며 진해 또는 거담제거 작용에 뛰어나기 때문에 이를 유효성분으로 함유하는 약학조성물 또는 건강보조식품으로 복용이 용이하며, 장기간 복용하여도 부작용이 없어 안정하게 사용될 수 있고, 진해 또는 거담 제거를 위한 원료를 자연에 서식하는 식물로 대체함으로써 제조생산단가 절감과 산업화를 통한 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있을 것이다.

도면

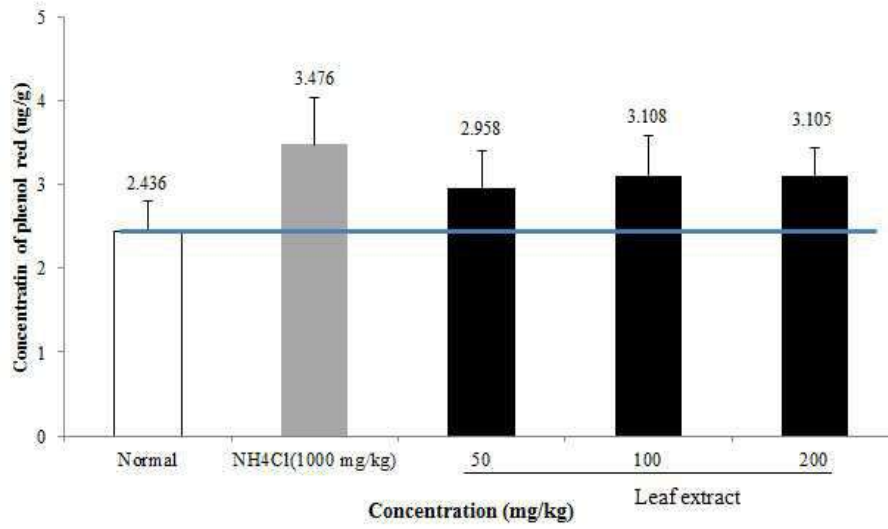
도면1



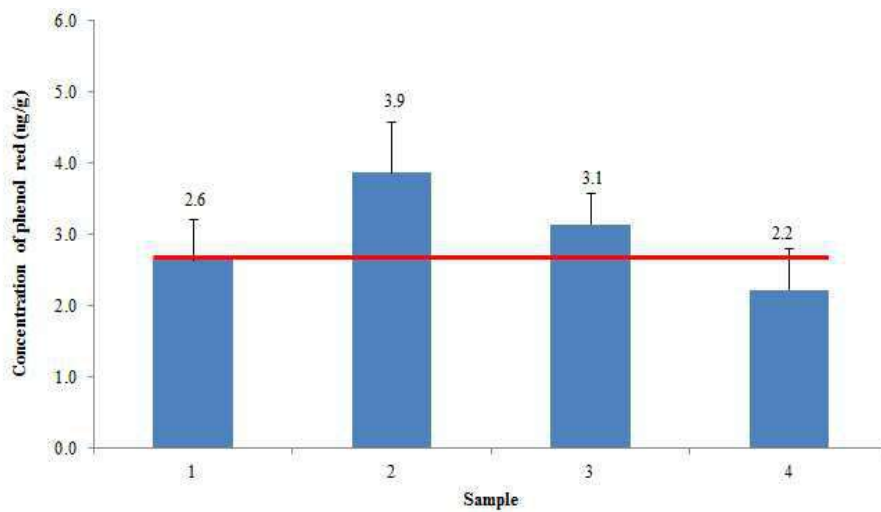
도면2



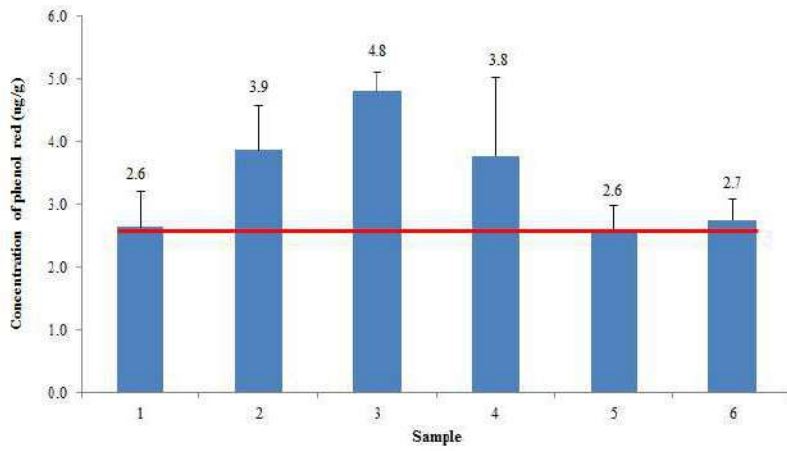
도면3



도면4

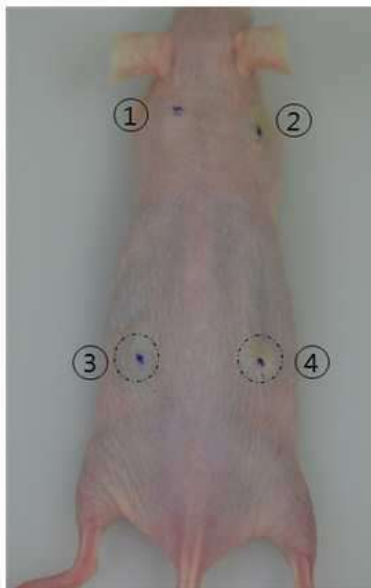


도면5



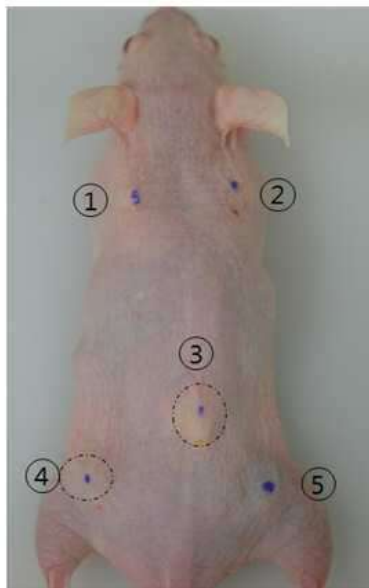
도면6

A: 황칠 물 추출물



① 10 mg/mL, ② 50 mg/mL, ③ 70 mg/mL, ④ 100 mg/mL

B: 황칠 분획물

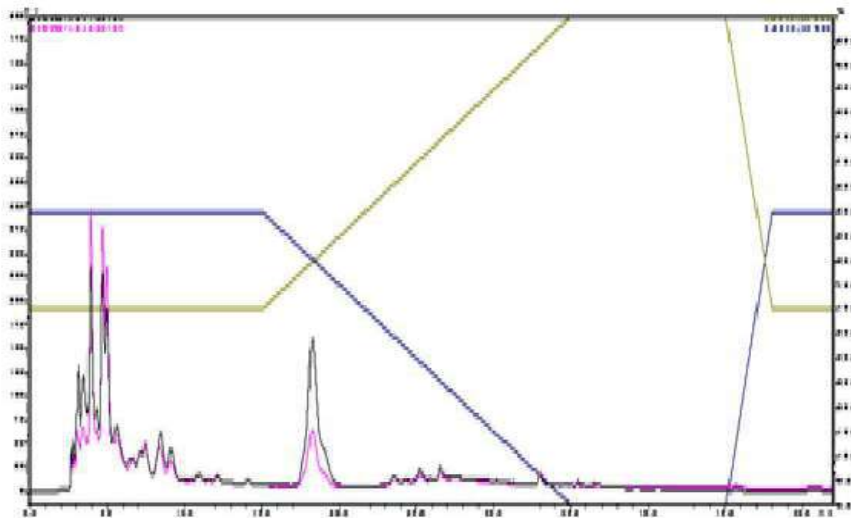


① 엑산 분획물(50mg/mL), ② 클로로포름 분획물(50mg/mL),  
③ 에틸아세테이트 분획물(50mg/mL), ④ 부탄올 분획물(50mg/mL)  
⑤ 물 분획물(50mg/mL)

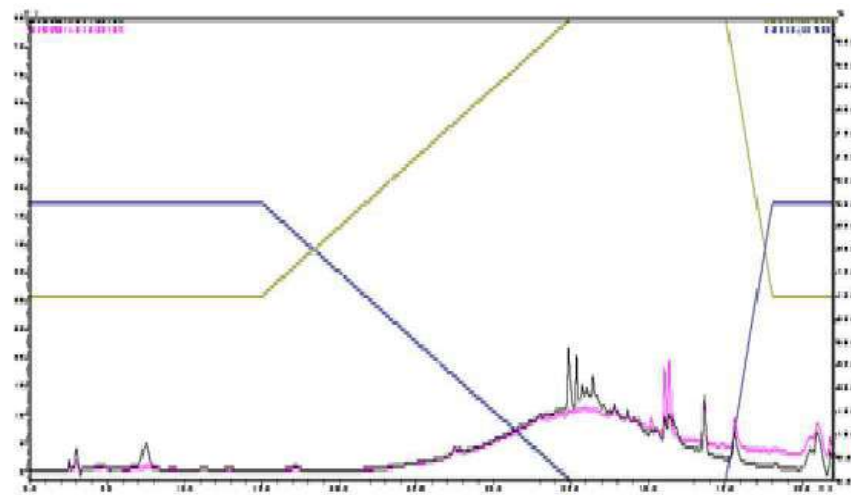
도면7



도면8



도면9





도면10

