



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0147996

(43) 공개일자 2014년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/05 (2006.01) A61K 36/605 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0071296

(22) 출원일자 2013년06월21일

심사청구일자 2013년06월21일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

임영희

서울특별시 서대문구 통일로25길 30, 108동 208호 (홍제동, 한양아파트)

김정근

서울 관악구 관악로30길 27, 118동 802호 (봉천동, 관악푸르지오1단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 10 항

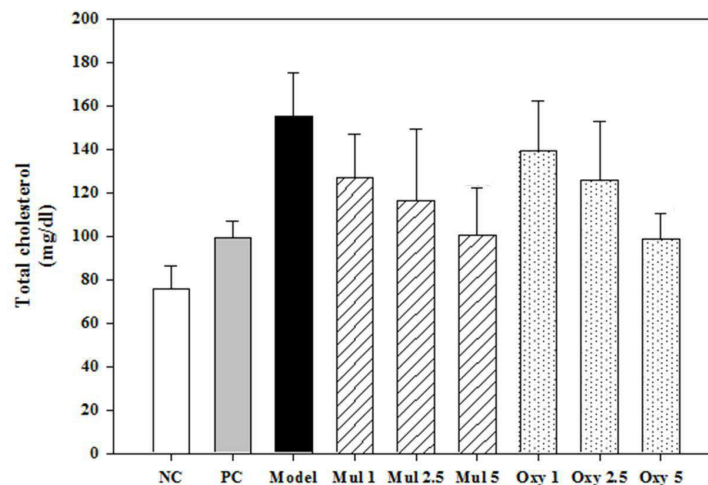
(54) 발명의 명칭 상백피 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물

### (57) 요약

본 발명은 상백피 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 멀베로사이드 A(mulberroside A) 및/또는 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol) 성분을 유효성분으로 하는 상백피 추출물을 함유하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 상백피 추출물에서 정제한 멀베로사이드 A 및/또는 옥시레스베라트롤이 에이치엠지 코에이(HMG-CoA; 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) 및 스쿠알렌 합성효소(squalene synthase)의 활성을 저해하여, 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 것을 확인하였으므로, 체내의 콜레스테롤 함량은 저하시켜 혈관계 질환의 예방 및 치료에 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**조성필**

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교

**김기환**

경기도 화성시 동탄지성로 405, 104동 1005호 (기  
산동, 대우푸르지오아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C00331180100388145

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업산업협력센터

연구사업명 산학연공동기술개발사업

연구과제명 Stibene계 물질의 항콜레스테롤 제제로의 소재화 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.06.01 ~ 2013.05.31

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)을 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 옥시레스베라트롤의 함량은 0.001 내지 20 중량% 인 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 옥시레스베라트롤은 상백피 유래인 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 옥시레스베라트롤은 HMG-CoA(3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) 환원효소 및 스쿠알렌 합성효소(squalene synthase)의 활성을 저해하는 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 멀베로사이드 A(mulberroside A)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 멀베로사이드 A는 상백피 유래인 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물.

### 청구항 7

제5항에 있어서, 멀베로사이드 A는 HMG-CoA(3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) 환원효소 및 스쿠알렌 합성효소(squalene synthase)의 활성을 저해하는 것을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 옥시레스베라트롤은 다음의 단계에 의해 제조된 것임을 특징으로 하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물:

- (a) 상백피에 물을 첨가하여 70 내지 90℃로 가열하여 1차 추출한 후, 남은 잔사에 물을 첨가하여 70 내지 90℃로 가열하여 2차 추출하는 단계;
- (b) 상기 1차 및 2차 추출물을 규조토로 여과시켜 상백피 추출물을 수득하고, 수득된 상백피 추출물을 흡착흡착수지를 이용하여 흡착시킨 후, 메탄올을 처리하여 흡착된 물질을 분리하는 단계;
- (c) 상기 분리된 물질을 진공 증류 및 건조시켜 파우더 형태의 상백피 추출물을 회수한 다음, 메탄올에 용해시켜 MPLC 및 TLC를 이용하여 멀베로사이드 A를 수득하는 단계; 및

(d) 상기 수득된 멀베로사이드 A에 펙티넥스(pectinex)를 처리하여 옥시레스베라트롤을 수득하는 단계.

## 청구항 9

제1항 내지 제8항 중에서 어느 한 항의 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물을 함유하는 기능성 식품.

## 청구항 10

제9항에 있어서, 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물의 함량은 0.001 내지 20 중량% 인 것을 특징으로 기능성 식품.

## 명세서

### 기술분야

[0001]

본 발명은 상백피 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 멀베로사이드 A(mulberroside A) 및/또는 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol) 성분을 유효성분으로 하는 상백피 추출물을 함유하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002]

콜레스테롤은 우리 몸의 뇌, 신경, 근육, 피부, 간, 창자, 심장 등 어디에나 존재하며 체내에서 세포막의 구성 성분으로 작용하며 호르몬, 비타민 D, 지질 소화와 관련된 담즙산의 원료로 작용하는 등 여러 가지 생리 생화학적 반응에 관여하는 중요한 물질로 알려져 있다. 그러나 한편으로는 최근 환자 발생이 급격히 늘어나고 있는 대표적인 성인병 중의 하나인 동맥경화증, 제2형 당뇨병 등을 비롯한 심혈관 질환 발병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고 있다. 콜레스테롤은 우리 체내에 없어서는 안 될 중요한 물질이나 콜레스테롤이 과잉으로 존재하면 혈관내피 세포나 혈관내막에서 축적되어 동맥경화소를 형성하여 고지혈증과 같은 혈관질환을 유발하고 고지혈증은 동맥경화, 고혈압, 비만, 당뇨 등과 같은 이차적인 질환을 유발한다. 이와 같이 혈중 총콜레스테롤은 관상동맥 질환 발생과 밀접한 상관성을 나타내므로 혈중의 콜레스테롤 항상성을 유지하는 것은 매우 중요하다. 혈중 콜레스테롤은 간세포에서의 합성 및 장세포에서의 재흡수에 의해 일정 수준의 혈중 콜레스테롤수치가 유지된다.

[0003]

고지혈증이란 혈액 중에 필요 이상의 콜레스테롤 또는 중성지방의 농도가 존재하여 염증을 유발하는 상태를 의미하며 특별한 증세를 나타내지 않으나 고혈압, 동맥경화, 뇌졸중 등의 위험 요인이 되고 있다.

[0004]

체내에서 적절한 콜레스테롤 조절 기능이 원활히 이루어지지 않아 콜레스테롤이 축적될 경우 혈액 내 총콜레스테롤 수치가 높아지는 고콜레스테롤혈증이 나타나며, 콜레스테롤 대사조절에 이상이 생긴 경우 총콜레스테롤뿐 아니라 LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 등 지단백(lipoprotein) 성분이 양적으로 변화하게 된다. LDL-콜레스테롤은 동맥벽에 침전되어 혈관에 상처를 입히고 동맥경화를 유발하는 반면, HDL-콜레스테롤은 해로운 LDL-콜레스테롤을 제거하고 동맥경화, 심장병, 뇌졸중과 같은 심혈관질환을 줄여준다. 따라서 총콜레스테롤의 수치가 정상인 경우라도 LDL 콜레스테롤이 높거나 HDL 콜레스테롤의 양이 낮으면 동맥경화의 원인이 되기도 한다.

[0005]

동물모델을 이용한 여러 연구들에 의하면 추출물 투여군에서의 콜레스테롤과 중성지방의 저하는 고지혈증을 예방할 수 있으며 HDL 콜레스테롤 비율이 LDL 콜레스테롤 비율보다 증가하는 것으로 나타나 동맥경화지수를 낮추는 것으로 보고되었으며, 추출물 투여에 의해 혈관계 장애로 인해 발병되는 고혈압, 당뇨, 뇌혈관질환, 동맥경화증과 같은 질환을 예방하는 것으로 보고되었다 (임계택 *et.al.*, *한국식품 과학회지*, 37(4):624, 2005); 최준혁 *et. al.*, *한국식품영양과학회지*, 41(7):957, 2012).

[0006]

고지혈증의 현행약물로는 크게 콜레스테롤의 생합성 저해제와 콜레스테롤의 흡수억제제로 나눌 수 있으며, 그 종류로는 스타틴계, 피브레이트계, ACAT저해제 등이 사용되고 있다. 그 중 스타틴계 약물은 간세포의 콜레스테롤 생합성 효소를 저해하는 기전으로 가장 많은 종류의 약물이 있고, 고지혈증 치료제의 주류를 이루고 있다. 이 중, 화이자사의 'Lipitor' 는 2005년을 기준으로 국내 고지혈증 치료제 시장에서 38.26%의 높은 점유율을 차지하고 있다. 그러나 스타틴계(statin) 약물을 비롯한 고지혈증의 현행 약물은 안전성 문제로 끊임없이 문제가 제

기되고 있으며, 특히 스타틴계에 의한 근육장애는 근육통, 근육의 저하, 보행 장애, 저림 등 근육이 굳어지는 증상을 초래한다 (이근임, 손은수, 고지혈증 치료제의 개발동향, 한국과학기술정보연구원, 2005; Derek M. Fine et. al., *Clinical Pharmacology*, 3(10):554, 2003).

[0007] 지금까지 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추는 효과에 대한 연구로는 천연물유래 콜레스테롤 개선 효과를 보이는 기능성 원료로 창녕양파추출액, 보리베타글루칸 추출액, 아마인, 보이차 추출물, 홍국쌀, 식물스타놀에스테르, 폴리코사놀-사탕수수왁스알코올, 스피루리나, 유니백스대나무추출물, 씨제이히비스커등복합추출물, 알로에복합추출물분말, 알로에추출물분말 등에 대한 연구가 있다. 고콜레스테롤 환자들에게 약물 치료와 병행하여 지속적인 치료와 예방효과를 동시에 나타낼 수 있는 물질을 천연물로부터 분리하여 투여하고자 천연물로부터 콜레스테롤 저하 효과가 있는 물질을 분리하는 연구가 계속적으로 진행 중이다.

[0008] 한편, 상백피(桑白皮: *Morus alba* root)는 뽕나무 뿌리껍질로서 두께는 1-4mm이며 외표면은 백색 또는 담황백색으로 비교적 평탄하고 황색 또는 황갈색의 비늘무늬가 있다. 상백피에 대한 연구는 항균, 항알러지, 항산화 및 발모 등에 다양한 효능연구가 보고된 바 있으며, 그 중 항알러지효능 연구에 대한 보고가 많이 이루어지고 있다 (Kor. J., *Pharmacogn.*, 29(1):1, 1998; J. Kor., *Oriental pediatrics*, 19(2):175, 2005; Kor. J., *Oriental P&P.*, 21(4):934, 2007).

[0009] 상백피에서 많은 성분들이 분리되었으며, 이들에 관한 많은 연구가 있어왔다. 상백피에서 분리된 모라신 O(moracin O), 모라신 P(moracin P) 및 멀베로퓨란 H (mulberrofulan H)는 각종 암 및 당뇨병성 막망증을 유발하는 저산소유도인자-1(Hypoxia Inducible Factor-1; HIF-1)의 활성을 억제하는 작용이 있는 것으로 공지되어 있으며(대한민국 등록특허 제0902094호), 모라신 M(moracin-M)의 경우 당뇨병성 쥐에서 혈당강화 작용이 보고되어 있다 (Zang M., et. al., *Fitoterapia*, 80(8):475, 2009). 또한, 쿠아논 L(kuwanon-L)은 단백질 티로신 포스파타제 1B1(protein tyrosin phosphatase 1B1, PTP1B1) 억제작용이 있으며(Cui L., et. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(5):1426, 2006), 모린(morin, 3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone)은 저밀도 지단백질(low density lipoprotein, LDL)의 당화 작용 억제효과 및 TGF 수용체 II의 길항 작용이 보고되어 있다 (Gaffari M. A., et. al., *Iran Biomed. J.*, 11(3):185, 2007; Shimanuki T., et. al., *Oncogene*, 26(23):3311, 2007).

[0010] 상기 상백피에서 분리된 물질 외에도 멀베로사이드 A(mulberroside A), 멀베로퓨란 G(mulberrofulan G), 멀베로퓨란 K(mulberrofulan K), 쿠아논 G(kuwanon G), 쿠아논 Z(kuwanon Z), 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol), 2', 4', 5, 7-테트라하이드록시플라바논(2', 4', 5, 7- tetrahydroxyflavanone), 모루시그닌L(morusignin L) 및 디하이드로모린(dihydromorin) 등이 상백피 단일물질로 공지되어 있다 (대한민국 공개특허 제2012-0111771호).

[0011] 멀베로사이드 A(mulberroside A)는 상백피의 주요 구성성분의 하나인 당화스틸벤(glycosylated stilbene)으로, 티로시나제(tyrosinase) 저해 작용(Kim JK et. al., *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37(6):631, 2010), 혈중 콜레스테롤 저하효과, 항비만효과 및 항산화 효과(Hesham A. El-Beshbishy et al., *Life Sciences*, 78:2724, 2006; 일본 공개특허 제2010-202558호)를 가지는 것으로 알려져 있다.

[0012] 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)은 멀베로사이드 A의 효소전환을 통한 아글리콘(aglycon)으로 대한민국 공개특허 제2010-0056422호에 상백피에서 분리 제조방법이 개시되어 있으며, 상기 특허에는 미백작용에 대해 기재하고 있고, 항산화 작용(Lorenz P., et. al., *Nitric Oxide*, 9(2):64, 2003), 항염 작용(Jung K. O., et. al., *J Pharm Pharmacol.*, 55(12):1695, 2003), 당뇨병병증의 원인물질인 최종당화산물의 생성 억제효과(대한민국 공개특허 제2012-0111771호) 등이 알려져 있다.

[0013] 종래의 기술에서 멀베로사이드 A의 혈중 콜레스테롤 저하효과에 대해 이미 알려져 있으나(Hesham A. El-Beshbishy et al., *Life Sciences*, 78:2724, 2006), 멀베로사이드 A뿐만 아니라 다양한 성분(5,7,2V-trihydroxyflavanone-4V-O-h-dglucoside, albanols A 및 albanols B)을 포함하는 상백피 추출물의 콜레스테롤 저하효과를 확인한 것으로, 멀베로사이드 A를 단독으로 처리하였을 때의 효과에 대해서는 기재되어 있지 않으며, 옥시레스베라트롤의 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물에 대한 개시는 없었다.

[0014] 이에, 본 발명자들은 상백피 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 상백피 추출물에서 정제한 멀베로사이드 A 및/또는 옥시레스베라트롤이 HMG-CoA(3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) 및 스쿠알렌 합성효소(squalene synthase)의 활성을 저해하여, 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0015] 본 발명의 목적은 상백피 유래의 멀베로사이드 A(mulberroside A) 및/또는 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)을 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0016] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)을 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 상기 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물을 함유하는 기능성 식품을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0018] 본 발명의 상백피 추출물에서 정제한 멀베로사이드 A 및/또는 옥시레스베라트롤이 에이치엠지 코에이(HMG-CoA; 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) 및 스쿠알렌 합성효소(squalene synthase)의 활성을 저해하여, 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 것을 확인하였으므로, 체내의 콜레스테롤 함량은 저하시켜 혈관계 질환의 예방 및 치료에 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤을 투여한 실험군에서 총콜레스테롤 함량을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤을 투여한 실험군에서 중성지방 함량을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤을 투여한 실험군의 간세포(200X)를 나타낸 그래프이다 (A: 정상식이, B: 고콜레스테롤 식이(HCD), C: HCD + 1mg/kg/day 심바스타틴, D: HCD + 1mg/kg/day 멀베로사이드 A, E: HCD + 2.5mg/kg/day 멀베로사이드 A, F: HCD + 5mg/kg/day 멀베로사이드 에이, G: HCD + 1mg/kg/day 옥시레스베라트롤, H: HCD + 2.5mg/kg/day 옥시레스베라트롤, I: HCD + 5mg/kg/day 옥시레스베라트롤).
- 도 4는 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤의 HMG-CoA 환원효소 저해효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤의 스쿠알렌 합성효소 저해효과를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0021] 본 발명은 일 관점에서, 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)을 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 옥시레스베라트롤의 함량은 0.0001 내지 20 중량% 인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 옥시레스베라트롤은 상백피 유래인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물은 멀베로사이드 A(mulberroside A)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 옥시레스베라트롤은 멀베로사이드 A에 펙티넥스(pectinex),  $\beta$ -글루코시다아제( $\beta$ -glucosidase), 탄나아제(tannase) 및 펙티나아제(pectinase) 등의 효소를 처리하여 제조하는 것을 특징으로 하며, 본 발명의 상백피 유래의 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤의 제조방법은 다음과 같다 : (a) 상백피에 물을 첨가하여 70

내지 90℃로 가열하여 1차 추출한 후, 남은 잔사에 물을 첨가하여 70 내지 90℃로 가열하여 2차 추출하는 단계; (b) 상기 1차 및 2차 추출물을 건조도로 여과시켜 상백피 추출물을 수득하고, 수득된 상백피 추출물을 합성흡착 수지를 이용하여 흡착시킨 후, 메탄올을 처리하여 흡착된 물질을 분리하는 단계; (c) 상기 분리된 물질을 진공 증류 및 건조시켜 파우더 형태의 상백피 추출물을 회수한 다음, 메탄올에 용해시켜 MPLC 및 TLC를 이용하여 멀베로사이드 A를 수득하는 단계; 및 (d) 상기 수득된 멀베로사이드 A에 펙티넥스(pectinex)를 처리하여 옥시레스베라트롤을 수득하는 단계를 포함한다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서, 상백피에 물을 넣고 열수처리하여 1차 추출물 및 2차 추출물을 회수한 뒤에 규저토를 처리한 후 여과시켜, 맑은액의 상백피 추출물을 회수하였으며, 상기 방법으로 얻은 상백피 추출물을 합성흡착 수지를 이용하여 파우더 형태의 상백피 추출물을 회수하였다. 회수된 상백피 추출물에서 멀베로사이드 A를 정제하기 위해, 파우더 형태의 상백피 추출물을 메탄올에 용해시킨 후, MPLC 및 TLC를 이용하여 최종적으로 4.8 g의 멀베로사이드 A를 수득하였다.

[0027] 상기 정제된 멀베로사이드 A의 일부에 펙티넥스(pectinex)를 처리하여 가수분해를 시킨 다음, 정제과정을 통해 최종적으로 1.2 g의 옥시레스베라트롤을 수득하였다.

[0028] 본 발명의 다른 실시예에서 본 발명에서 분리한 멀베로사이드 A와 옥시레스베라트롤의 혈중 콜레스테롤 저하 효과를 확인하기 위해서, 생쥐에 고콜레스테롤을 유도시킨 다음, 멀베로사이드 A와 옥시레스베라트롤을 농도별(1 mg/kg body weight, 2.5mg/kg body weight, 5mg/kg body weight)로 제조하여 매일 1회 경구투여 하여 4주 동안 사육하였다. 사육이 끝난 실험동물의 심장에서 혈액을 채취하여 총 콜레스테롤 함량, 중성지방, HDL 콜레스테롤 함량, LDL 콜레스테롤 함량 및 동맥경화지수를 산출하였다.

[0029] 총 콜레스테롤의 경우, 고콜레스테롤식이 대조군(Model)에서 정상군(NC)보다 혈액 내 총 콜레스테롤 농도가 높아졌음을 확인할 수 있었고, 고콜레스테롤식으로 인하여 증가된 혈청 총콜레스테롤은 상백피 추출물을 함께 섭취하는 경우 유의적( $p < 0.05$ )으로 감소됨을 알 수 있었다 (도 1). 멀베로사이드 A와 옥시레스베라트롤 모두 투여 농도에 따라 총콜레스테롤(total cholesterol) 농도가 낮아지는 것을 확인하였다. 특히, 고콜레스테롤증 유도 모델 동물에 옥시레스베라트롤 5mg/kg/day 투여시, 대조군에 비해 36.5%의 총콜레스테롤을 감소시키는 것을 확인하였다.

[0030] 또한, 멀베로사이드 A와 옥시레스베라트롤 투여군에서 중성지방(도 2) 및 LDL 콜레스테롤(표 3)이 감소하고, HDL 콜레스테롤(표 3)이 증가한 것을 확인하였다. 특히, 옥시레스베라트롤 5mg/kg/day 투여시, 대조군에 비해 21%의 HDL 콜레스테롤이 증가하였으며, 53.3%의 LDL 콜레스테롤이 감소하였다.

[0031] 동맥경화 지수 및 관상동맥경화지수 경우에도, 멀베로사이드 A와 옥시레스베라트롤 투여군에서 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 특히 옥시레스베라트롤 5mg/kg/day 투여시, 대조군에 비해 동맥경화 지수 및 관상동맥경화지수가 크게 감소한 것을 확인하였다 (표 3).

[0032] 본 발명의 상백피 유래 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤의 만성독성 여부를 확인하기 위해, 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤 투여군 생쥐의 체중증가량 및 간 무게를 측정하였으며, 혈청의 AST, ALT 효소 활성 등을 비교하였다 (표 4). 그 결과, 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)을 5mg/kg body weight 농도로 투여한 군에서 대조군에 비해 체중 및 간 무게가 감소하는 것을 확인하였으나, 혈청의 AST, ALT 효소 활성 등을 비교한 결과 대조군에 비해 유의적 차이를 보이지 않는 것으로 보아, 상백피 추출물유래 유효성분의 장기 복용으로 인한 독성은 없는 것으로 관찰되었다.

[0033] 또한, 간조직에서 지방구 감소 정도를 측정하기 위해, 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤 투여군의 간조직을 H&E 염색하여 지방구 감소를 측정된 결과, 상백피 추출물 유래 멀베로사이드 A 와 옥시레스베라트롤 투여군에서 농도 의존적으로 간조직내의 지방구들이 현저히 감소함을 확인하였다 (도 3).

[0034] 본 발명에 있어서, 멀베로사이드 A 또는 옥시레스베라트롤은 HMG-CoA(3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) 환원효소의 활성을 저해하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 멀베로사이드 A 또는 옥시레스베라트롤은 스쿠알렌 합성효소(squalene synthase)의 활성을 저해하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA(HMG-CoA, 에이치엠지 코에이) 환원효소는 간에서 콜레스테롤 합성 촉진 단계를 제어하는 효소로, 이 효소의 활성 저해제인 아트로바스타틴, 프라바스타틴, 심바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴 등 스타틴 계열의 약제들이 HMG-CoA 환원효소의 탁월한 억제물질로 세계적으로 수많은 사람들이 콜레스

테롤 수치를 낮추기 위해 복용하고 있지만, 스타틴 계열의 약제는 근육병, 횡문근융해, 간수치 상승 등의 부작용이 있다.

[0037] 스쿠알렌 합성효소(squalene synthase)는 콜레스테롤 합성의 또 다른 주요한 효소이며 스쿠알렌 합성효소의 저해는 혈액 내의 콜레스테롤 수치를 낮추는 방법의 대안으로 유망하다고 제안하고 있지만, 스쿠알렌 합성효소 저해제는 간 독성 때문에 콜레스테롤을 저해시키는 약제 개발에 어려움이 있다.

[0038] 본 발명의 다른 실시예에서 상백피 유래 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤의 혈중 콜레스테롤 감소 효과가 HMG-CoA 환원효소 및 스쿠알렌 합성효소 활성화와 관계가 있는지 알아보기 위해, 생쥐의 간에서 마이크로솜을 분리하여 실험에 사용하였으며, 분리한 마이크로솜에 1 내지 20  $\mu$ M 농도의 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤을 처리하여 HMG-CoA 환원효소 및 스쿠알렌 합성효소의 활성을 측정하였다. 그 결과, HMG-CoA 환원효소의 경우, 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤, 양성대조군으로 사용한 프라바스타틴 모두 농도 의존적으로 HMG-CoA 환원효소 활성을 저해하는 것을 확인하였으며, 20  $\mu$ M 농도에서 프라바스타틴, 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤은 각각  $118.1 \pm 30.2$  nmol/min/mg protein,  $224.0 \pm 50.0$  nmol/min/mg protein 및  $177.2 \pm 58.4$  nmol/min/mg protein의 HMG-CoA 환원효소 활성을 보였다 (도 4). 스쿠알렌 합성효소의 경우, 양성대조군인 심바스타틴과 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤 모두 농도 의존적으로 스쿠알렌 합성효소를 저해하는 것을 확인하였으며, 심바스타틴, 멀베로사이드 A(mulberroside A) 및 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)은 10  $\mu$ M 농도에서 음성대조군에 비해 각각  $19.9 \pm 1.1\%$ ,  $59.1 \pm 1.6\%$  및  $38.6 \pm 1.0\%$ 로 스쿠알렌 합성효소가 저해되는 것을 확인하였다 (도 5). 특히, 어글라이콘 형태인 옥시레스베라트롤이 멀베로사이드 A에 비해 HMG-CoA 환원효소 및 스쿠알렌 합성효소 저해효과가 높은 것을 확인하였다.

[0039] 본 발명의 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물은 이미 사용되고 있는 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적mg/kg 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 상백피 유래 멀베로사이드 A 및/또는 옥시레스베라트롤을 포함하는 약학 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 있다.

[0041] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 10mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 경구 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0043] 본 발명은 다른 관점에서, 옥시레스베라트롤 및/또는 멀베로사이드 A를 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물을 함유하는 기능성 식품에 관한 것이다.

[0044] 본 발명에 있어서, 기능성 식품에 포함된 혈중 콜레스테롤 저하제 조성물의 함량은 0.001 내지 20 중량% 인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 '기능성 식품'이란, 일반 식품에 본 발명의 추출물을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다. 기능성은 물성 및 생리기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 추출물을 일반식품에 첨가할 경우, 일반 식품의 물성 및 생리기능성이 향상될 것이고, 본 발명은 이러한 향상된 기능의 식품을 포괄적으로 '기능성 식품'이라 정의한다.

[0046] 상기 외에 본 발명의 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 조콜릿 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. 그 밖에 본 발명의 추출물은 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 추출물 100 중량부 당 0.01-20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

### 실시예 1

[0048] **멀베로사이드 A(mulberroside A) 및 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol) 제조**

[0049] 상백피(안동, 건화약품) 3.6kg을 물 18kg에 넣고 80℃로 가온하여 4시간 동안 1차 추출하였다. 냉각 후 추출액을 분리하여 1차 추출액 15kg을 회수한 뒤, 남은 잔사에 물 15kg을 사용하여 동일조건으로 2차 추출하여 추출액 15kg을 얻었다. 1, 2차 추출액에 규조토를 처리 한 후 여과(Filter press, SA 955) 하여 맑은 액의 상백피 추출물을 얻었다.

[0050] 상기의 방법으로 얻은 상백피 추출물을 합성흡착수지(SP 207, DIAION) 3ℓ를 사용하여 유속 20ml/min으로 통과시켜 흡착시킨 후 물 8ℓ를 사용하여 세척하였다. 흡착된 물질을 분리하기 위해 메탄올(methanol) 6ℓ를 통과시켜 얻은 액을 진공증류 및 건조하여 상백피 추출 파우더(powder) 80g을 얻었다.

[0051] 상기 상백피 추출 파우더는 메탄올에 다시 용해시킨 후 실리카 레진 컬럼(silica resin column)을 이용하여 MPLC(medium-pressure liquid chromatography)를 실시하였다. 이동상은 클로로포름(chloroform)과 메탄올(2.5:1)을 사용하고 유속(flow rate)은 10ml/min을 유지하였다. 그 후, TLC(Thin layer chromatography)을 실시하여 최종적으로 4.8g의 멀베로사이드 A를 얻었다.

[0052] 상기 정제된 멀베로사이드 A의 일부를 4ml의 아세트이드 버퍼(acetate buffer; pH 4.0) 및 0.88ml의 펙티네스(pectinex)와 혼합하여 60℃에서 4 시간 동안 120rpm에서 배양한 다음 95℃에서 2 분 동안 열처리하여 효소활성을 저해시킨 후 흡착수지(adsorbent resin)에 다시 흡수시켰다. 그 후, 흡착수지를 물로 세척한 후 다시 아세트온으로 세척하였다. 그리고 진공상태에서 50℃로 건조시켜서 분말을 얻은 후 메탄올에 녹여 상기와 같은 방법으로 MPLC와 TLC를 거쳐서 1.2g의 옥시레스베라트롤을 얻었다.

### 실시예 2

[0053] **상백피 추출물 유래 멀베로사이드 A(mulberroside A) 및 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)의 혈중 콜레스테롤 저하 효과 확인**

[0054] 2-1 : 실험동물 사육 및 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)의 투여

[0055] 생후 5주된 SD(Sprague-Dawley, 95~105g)종 웅성 흰쥐를 1주일간의 순화 사육과정을 거친 후에 임의로 6마리씩 9군으로 나누어 배정하였으며 4주 동안 사육하였다 (표 1). 동물 사육실의 온도는  $22 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 와 습도  $55 \pm 5\%$ , 채광은 12시간 명암조절(명주기: 08:00~20:00)을 유지하였다. 물은 자유로이 먹을 수 있도록 하였고 사료는 매일 한 번 일정한 시간에 공급하며 섭취량을 측정하였고, 체중은 일주일에 1회 측정하였다.

### 표 1

[0056] 실험군의 지정과 상백피 추출물의 복용량

| Treatment groups | Diet      | Treatment of test compound |
|------------------|-----------|----------------------------|
| 음성대조군(NC)        | 정상 식이     | 증류수 10mg/kgB.W             |
| 양성대조군(PC)        | 고콜레스테롤 식이 | 심바스타틴 1mg/kgB.W            |
| Model            | 고콜레스테롤 식이 | 증류수 10mg/kgB.W             |
| Mul 1            | 고콜레스테롤 식이 | 멀베로사이드 A 1mg/kgB.W         |

|         |           |                      |
|---------|-----------|----------------------|
| Mul 2.5 | 고콜레스테롤 식이 | 멜베로사이드 A 2.5mg/kgB.W |
| Mul 5   | 고콜레스테롤 식이 | 멜베로사이드 A 5mg/kgB.W   |
| Oxy 1   | 고콜레스테롤 식이 | 옥시레스베라트를 1mg/kgB.W   |
| Oxy 2.5 | 고콜레스테롤 식이 | 옥시레스베라트를 2.5mg/kgB.W |
| Oxy 5   | 고콜레스테롤 식이 | 옥시레스베라트를 5mg/kgB.W   |

[0057]

상기 표 1의 9개의 그룹의 각각의 군에 대하여 실시예 1에서 얻은 멜베로사이드 A와 옥시레스베라트를 농도별 (1mg/kg body weight, 2.5mg/kg body weight, 5mg/kg body weight)로 제조하여 매일 1회 경구투여 하였다. 정상식이군(NC)과 고콜레스테롤식이군(Model) 중 시료를 투여하지 않은 대조군에는 증류수(distilled water)를 같은 방법으로 투여하였으며, 실험동물의 성장단계를 고려하여 표 2에 나타난 바와 같이 사료를 배합하여 각 군에 맞게 급여하였다.

## 표 2

[0058]

### 사료의 조성

| Components     | Normal diet (g/100 g) | Cholesterol diet (g/100 g) |
|----------------|-----------------------|----------------------------|
| Casein         | 18.00                 | 18.00                      |
| Mineral mix1   | 4.00                  | 4.00                       |
| Vitamin mix1   | 1.00                  | 1.00                       |
| Corn oil       | 5.00                  | 5.00                       |
| Sucrose        | 5.00                  | 5.00                       |
| Starch         | 61.80                 | 60.55                      |
| Sodium cholate | -                     | 0.25                       |
| Methionine     | 0.20                  | 0.20                       |
| Cholesterol    | -                     | 1.00                       |
| Cellulose      | 5.00                  | 5.00                       |

[0059]

### 2-2 : 총 콜레스테롤 함량 측정

[0060]

사육이 끝난 실험동물을 12시간 동안 절식시키고 에테르로 마취시킨 후 주사기를 이용하여 심장으로부터 혈액 3 내지 5ml을 채취하였다. 채취한 혈액의 일부는 실온에 방치시킨 후 10000 x g 조건으로 4℃에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중의 총 콜레스테롤(total cholesterol)함량은 Fusi Dri-chem 4000i(후지, 일본)를 이용하여 측정하였으며, 이 방법은 FUSI DRI-CHEM 전용 슬라이드 키트(slide kit)를 이용하여 반자동으로 각각의 혈중 함량을 mg/dl로 표시한다.

[0061]

본 실험에서 얻어진 모든 결과치는 SPSS 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 검정하여 평균치와 표준오차로 나타내고, 각 군간의 유의성 검정은 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)으로 실시하였다.

[0062]

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 고콜레스테롤식이 대조군(Model)에서 정상군(NC)보다 혈청 총 콜레스테롤 농도가 높아졌음을 확인할 수 있었고, 고콜레스테롤식으로 인하여 증가된 혈청 총콜레스테롤은 상백피 추출물을 함께 섭취하는 경우 유의적( $p < 0.05$ )으로 감소됨을 알 수 있었다.

[0063]

멜베로사이드 A와 옥시레스베라트를 모두 투여 농도에 따라 총콜레스테롤 농도가 낮아지는 것을 확인하였으며, 특히 고콜레스테롤증 유도 모델 동물에 옥시레스베라트를 5mg/kg/day 투여시, 대조군에 비해 36.5%의 총콜레스테롤을 감소시키는 것을 확인하였다.

[0064]

### 2-3 : 중성지방 함량 측정

[0065]

혈청중의 중성지방 함량도 Fusi Dri-chem 4000i(후지, 일본)를 이용하여 측정하였다. 이 방법은 FUSI DRI-CHEM 전용 슬라이드 키트(slide kit)를 이용하여 반자동으로 각각의 혈중 함량을 mg/dl로 표시하였다.

[0066] 그 결과, 멀베로사이드 A 와 옥시레스베라트를 투여군에서 중성지방이 감소하는 것을 확인하였다 (도 2).

[0067] 2-4 : HDL 콜레스테롤 함량, LDL 콜레스테롤 함량 및 동맥경화 지수 산출

[0068] 혈청중의 HDL 함량은 Fusi Dri-chem 4000i(후지, 일본)를 이용하여 측정하였다. 이 방법은 FUSI DRI-CHEM 전용 슬라이드 키트(slide kit)를 이용하여 반자동으로 각각의 혈중 함량을 mg/dL로 표시하였다.

[0069] 혈청 중의 LDL 콜레스테롤 함량은 Fiedewald식 총콜레스테롤(HDL + 중성지방/5) 계산법을 이용하여 산출하였다. 동맥경화 지수(atherogenic index : A.I.)는 LDL/HDL 식으로 각각 산출하였으며, 관상동맥질환 위험지수(coronary risk index, CRI)는 총콜레스테롤/HDL 식으로 계산하였다 (표 3).

표 3

[0070] HDL 콜레스테롤 함량, LDL 콜레스테롤 함량 및 동맥경화 지수

| Treatment groups | Mean value $\pm$ SD (mg/dL) |                  | AI            | CRI           |
|------------------|-----------------------------|------------------|---------------|---------------|
|                  | HDL                         | LDL              |               |               |
| 음성대조군(NC)        | 42.0 $\pm$ 6.2              | 19.9 $\pm$ 3.1   | 1.8 $\pm$ 0.1 | 0.6 $\pm$ 0.2 |
| 양성대조군(PC)        | 28.6 $\pm$ 5.8              | 111.5 $\pm$ 22.8 | 5.7 $\pm$ 1.9 | 4.5 $\pm$ 1.6 |
| Model            | 26.8 $\pm$ 3.0              | 54.7 $\pm$ 5.4   | 3.5 $\pm$ 0.3 | 2.1 $\pm$ 0.3 |
| Mul 1            | 30.6 $\pm$ 2.8              | 83.3 $\pm$ 19.4  | 4.1 $\pm$ 0.6 | 2.7 $\pm$ 0.6 |
| Mul 2.5          | 27.8 $\pm$ 2.9              | 76.9 $\pm$ 10.2  | 4.6 $\pm$ 0.5 | 3.0 $\pm$ 0.4 |
| Mul 5            | 27.8 $\pm$ 2.1              | 61.6 $\pm$ 17.2  | 3.8 $\pm$ 0.7 | 2.1 $\pm$ 0.4 |
| Oxy 1            | 30.8 $\pm$ 4.4              | 93.6 $\pm$ 24.0  | 4.7 $\pm$ 1.3 | 3.2 $\pm$ 1.2 |
| Oxy 2.5          | 30.0 $\pm$ 5.9              | 82.9 $\pm$ 23.9  | 3.8 $\pm$ 0.5 | 2.4 $\pm$ 0.4 |
| Oxy 5            | 34.6 $\pm$ 10.6             | 52.1 $\pm$ 15.8  | 2.8 $\pm$ 0.6 | 1.5 $\pm$ 0.5 |

[0071] 그 결과, HDL 콜레스테롤의 농도는 고콜레스테롤식이 대조군(Model)에 비해 멀베로사이드 A 와 옥시레스베라트를 농도에 따라 처리하였을 때, 유의적으로 증가 ( $p < 0.05$ )하는 것을 확인하였으며, 특히 옥시레스베라트를 5 mg/kg/day 투여시, 대조군에 비해 21%의 HDL 콜레스테롤이 증가하였다.

[0072] LDL 콜레스테롤의 농도는 정상군(NC)과 고지방식이 대조군(Model)에 비하여 상백피 추출 유래 유효성분을 함께 섭취하는 경우 농도에 따라 유의적( $p < 0.05$ )으로 감소하는 것을 확인하였으며, 특히 옥시레스베라트를 5mg/kg/day 투여시, 대조군에 비해 53.3%의 LDL 콜레스테롤이 감소하였다.

[0073] 동맥경화 지수는 정상군(NC)에 비해 고지방식이 대조군(Model)에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 증가한 것을 확인하였으며, 특히 옥시레스베라트를 5mg/kg/day 투여시, 대조군에 비해 동맥경화 지수가 크게 감소한 것을 확인하였다.

[0074] 관상동맥경화지수의 경우에도 정상군(NC)에 비해 고지방식이 대조군(Model)에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 증가한 것을 확인하였으며, 특히 옥시레스베라트를 5mg/kg/day 투여시, 대조군에 비해 농도의존적으로 동맥경화 지수가 크게 감소한 것을 확인하였다.

### 실시예 3

[0075] 독성시험

[0076] 상백피 추출물의 만성독성에 대한 설계를 위해서 실시예 2에서 4주 동안 실시한 동물실험 결과를 독성여부 판정의 근거로 하여 실시한 결과를 표 4에 나타내었다. 체중증가량은 수학적 1로 계산하였고, 상대적인 간 무게는 수학적 2로 계산하였다.

[0077] AST 및 ALT 함량은 Fusi Dri-chem 4000i(후지, 일본)를 이용하여 측정하였다. 이 방법은 FUSI DRI-CHEM 전용 슬라이드 키트(slide kit)를 이용하여 측정 후 측정기기에 내장된 프로그램내의 공식에 의해 자동으로 계산되어

각각의 혈중 함량을 IU/ℓ 로 표시하였다.

[수학식 1]

체중증가량 = ((29일째 체중 - 1일째 체중)/1일째 체중) x 100

[수학식 2]

간 무게 = (생쥐 간 무게(g)/29일째 체중(g)) x 100

#### 표 4

멜베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤에 의한 독성시험

| Treatment groups | % Δweight   | Relative liver weight | Average daily food consumption (g/day) | AST (IU/ℓ)  | ALT (IU/ℓ) |
|------------------|-------------|-----------------------|----------------------------------------|-------------|------------|
| NC               | 137.3 ± 4.5 | 3.2 ± 0.42            | 19.9 ± 0.9                             | 66.2 ± 17.3 | 30.3 ± 3.1 |
| PC               | 130.2 ± 6.0 | 2.5 ± 0.25            | 21.0 ± 1.1                             | 56.7 ± 17.3 | 29.3 ± 5.0 |
| Oxy 1            | 134.7 ± 8.6 | 2.7 ± 0.31            | 20.6 ± 1.1                             | 64.7 ± 23.3 | 34.0 ± 7.8 |
| Oxy 2.5          | 132.8 ± 4.0 | 2.5 ± 0.18            | 20.0 ± 1.1                             | 57.7 ± 13.0 | 26.5 ± 6.7 |
| Oxy 15           | 124.0 ± 2.4 | 2.5 ± 0.15            | 20.1 ± 0.9                             | 63.0 ± 3.7  | 29.0 ± 4.9 |

일반사료 섭취군(NC)과 상백피 추출물 유래 유효성분을 각각 1, 2.5, 5mg/kg body wight 농도로 투여한 군간의 사료섭취량에 차이가 없었으며, 체중증가량 측정 결과 옥시레스베라트롤을 5mg/kg body wight 농도로 투여한 군에서 대조군에 비해 유의적( $p < 0.05$ )으로 체중 감소가 확인되었다.

간 무게의 경우는 양성대조군 및 옥시레스베라트롤을 2.5 및 5 mg/kg body wight 농도로 투여한 군이 음성대조군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였다. 혈청의 AST, ALT 효소 활성 등을 비교한 결과 대조군에 비해 유의적 차이를 보이지 않는 것으로 보아, 상백피 추출물유래 유효성분의 장기 복용으로 인한 독성은 없는 것으로 관찰되었다.

#### 실시예 4

간조직에서의 지방구 감소

간조직에서의 지방구를 측정하기 위해 실시예 2에서 4주 동안 실험한 생쥐의 간을 적출하여 10% formalin에 고정 후, 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 절단하여 5μm 조직절편을 만든 후 H&E(Hematoxylin-Eosin) 염색하고, 현미경을 이용하여 200배 확대하여 조직의 모양을 관찰하여 지방구 감소정도를 측정하였다.

그 결과, 상백피 추출물 유래 멜베로사이드 A와 옥시레스베라트롤 투여군에서 농도 의존적으로 간조직내의 지방구들이 현저히 감소함을 확인하였다 (도 3).

#### 실시예 5

멜베로사이드 A(mulberroside A) 및 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)에 의한 HMG-CoA(3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) 및 스쿠알렌 합성효소(squalene synthase)의 활성 저해

[0089] 5-1 : 간 마이크로솜 분리

[0090] 약 200 g의 수컷 SD(Sprague-Dawley, 95-105 g)를 사용하였으며, 실험동물은 엄격한 표준 환경에서(온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ; 습도  $55 \pm 5\%$ ; 12시간 조명주기) 사육하였다. 본 실험 전 7일간 사료(standard rodent chow, Purina, Framingham, MA, USA)와 식수는 자유롭게 급여하였으며, 모든 동물실험은 고려대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받았으며(승인번호: KUIACUC-2012-100), 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침에 따라 실행하였다(NIH Publication No. 85-23, 1996).

[0091] 생쥐의 간에서 마이크로솜을 분리하기 위해, 1주일간의 순화 사육과정을 거친 생쥐를 디에틸에테르(diethyl ether)로 마취시킨 후, 간을 적출하여 얼음에 담겨진 염화나트륨(NaCl) 용액에 재빨리 담구다. 간 적출 후 모든 실험 진행은  $4^\circ\text{C}$ 에서 진행하였으며, 간의 무게를 재어 3배 부피의( $\text{mL/g}$ ) 균질화 용액( $0.1 \text{ M sucrose}$ ,  $0.05 \text{ M KCl}$ ,  $0.04 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.01 \text{ M } \beta\text{-mercaptoethanol}$ ,  $\text{pH}7.2$ )에 넣은 후 호모지나이저(MP FastPrep homogenizer; MP Biomedicals, 미국)를 이용하여 균질화 하였다.  $4^\circ\text{C}$ 에서  $10,000 \times g$ 로 15분간 원심분리 하였으며, 이 과정을 두 번 반복하여 조직의 잔해와 미토콘드리아를 제거하였다. 원심분리한 상등액을  $100,000 \times g$ 로 1시간 동안 초원심분리기(Optima ultracentrifuge; Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 원심분리 하였고, 하층에 가라앉은 마이크로솜에 동일한 버퍼를 넣고  $100,000 \times g$ 에서 45분간 다시 원심분리 하였다. 분리 후 상등액을 제거하고  $3\text{mL}$ 의 동일한 버퍼를 첨가하였다. 마이크로솜의 단백질 농도는 보바인 알부민 스탠다드를 이용한 Brad-ford법을 사용하여 측정하였다 (Bio-Rad, 미국).

[0092] 5-2 : HMG-CoA 환원효소 활성 저해

[0093] 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤의 HMG-CoA 환원효소 활성 저해효과를 알아보기 위해, 실시예 5-1에서 분리한 생쥐의 간에서 추출한 마이크로솜을 이용하여 측정하였다.

[0094] 간에서 추출한 마이크로솜  $30\mu\text{g protein/mL}$ ,  $50 \text{ mM Tris-HCl}(\text{pH } 7.5)$ ,  $0.2 \text{ mM NADPH}$ 를 포함하는 반응액에 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤은 각각 1 내지  $20\mu\text{M}$  농도가 되도록 하여 첨가하였으며, 반응액의 총 부피는  $1 \text{ mL}$ 이 되도록 하였다. 음성대조군으로 증류수(distilled water), 양성대조군으로 프라바스타틴(pravastatin)을 1 내지  $20\mu\text{M}$  농도가 되도록 첨가하였다. 효소반응은 반응효소인 HMG-CoA 환원효소( $0.6\text{mg protein/mL}$ )를 첨가하면서 시작하였으며,  $37^\circ\text{C}$ 를 유지하면서 진행하였다. HMG-CoA 환원효소 활성 저해는 산화되는 NADPH의 양을 분광광도계(U-2900 spectrophotometer; Hitachi, 일본)를 이용하여  $340\text{nm}$ 에서 측정하였다.

[0095] 효소활성은 반응속도를 매 15초 마다 5분간 측정하여 NADPH가  $\text{NADP}^+$ 로 전환되는 양을 다음 식에 의해 계산하여 표기하였으며, 효소 활성은  $\text{unit/mgP}$ 으로 환산하였다. unit는 분당  $1.0 \mu\text{mole}$ 의 NADPH가  $\text{NADP}^+$ 로 전환되는 양을 의미하며,  $\mu\text{mol/min/mg-protein}$ 으로 정의된다.

[0096] 결과값은  $\text{nmol/min/mg-protein}$ 값으로 환산하였으며, 계산공식은 수학적 식 3과 같다.

[0097] [수학적 식 3]

[0098]  $\text{unit/mgP} = ((A_{340}/\text{min}_{\text{sample}} - A_{340}/\text{min}_{\text{blank}}) \times 0.2) / (12.44 \times V \times 0.6 \times \text{LP})$

[0099] V: 효소의 양 ( $\text{mL}$ )

[0100] 0.6: 효소 농도( $\text{in mg-protein(mgP)}/\text{mL}$ ) ( $0.50\sim0.70 \text{ mgP}/\text{mL}$ )

[0101] LP: Light path(광 경로) in cm ( $0.55$  for path)

[0102] 그 결과, 음성대조군에서 HMG-CoA 환원효소 활성은  $640.1 \pm 45.9 \text{ nmol/min/mg protein}$ 으로 나타났으며, 프라바스타틴, 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤 모두 농도 의존적으로 HMG-CoA 환원효소 저해효과를 보이는 것을 확인하였다.  $20\mu\text{M}$  농도에서 프라바스타틴, 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤은 각각  $118.1 \pm 30.2 \text{ nmol/min/mg protein}$ ,  $224.0 \pm 50.0 \text{ nmol/min/mg protein}$  및  $177.2 \pm 58.4 \text{ nmol/min/mg protein}$ 의 HMG-CoA 환원효소 활성을 보였으며, 어글라이콘 형태인 옥시레스베라트롤이 멀베로사이드 A에 비해 1.3배 HMG-CoA

환원효소 저해효과가 높은 것을 확인하였다 (도 4).

[0103] 5-3 : 스쿠알렌 합성효소 활성 저해

[0104] 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤의 스쿠알렌 합성효소 활성 저해효과를 알아보기 위해, 실시예 5-1에서 분리한 생쥐의 간에서 추출한 마이크로솜을 이용하여 전구물질인 [ $^3$ H]FPP가 스쿠알렌으로 전환됨으로써 반응하지 않고 남은 [ $^3$ H]FPP를 측정하였다.

[0105] 간에서 추출한 마이크로솜 30 $\mu$ g protein/ml, 50mM phosphate buffer(pH 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM NADPH를 포함하는 반응액 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤은 각각 1 내지 10  $\mu$ M 농도가 되도록 하여 첨가하였으며, 반응액의 총 부피는 1ml이 되도록 하였다. 음성대조군으로 증류수(distilled water), 양성대조군으로 심바스타틴(simvastatin)을 1 내지 10  $\mu$ M 농도가 되도록 첨가하였으며, 실험물질과 심바스타틴은 DMSO에 녹여 사용하였다.

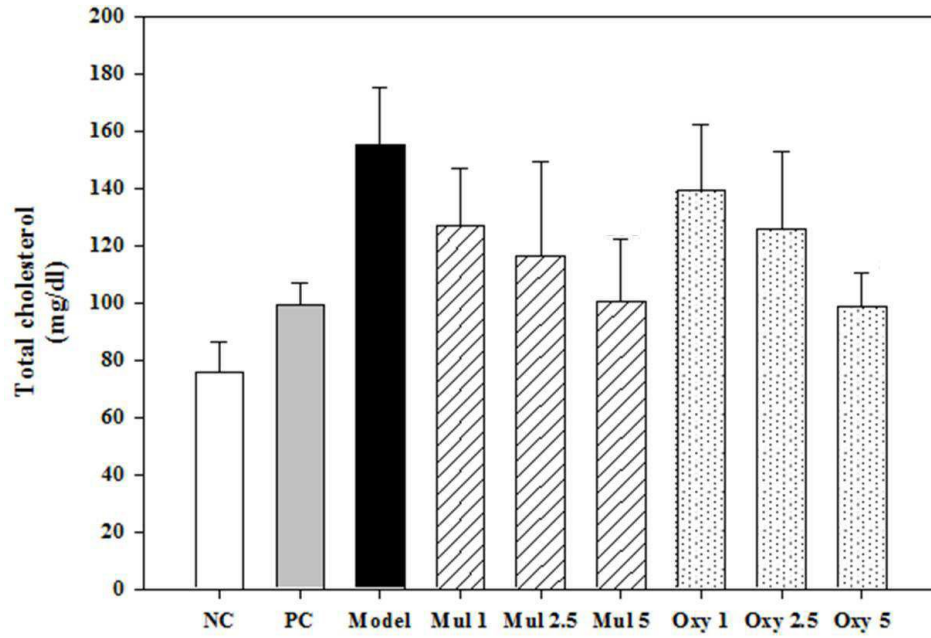
[0106] 반응용액을 20ml 스크류 캡 유리튜브에 넣고, 교반수조에서 80rpm, 37℃에서 10분간 방치한 후, [ $^3$ H]FPP(0.25  $\mu$ M, 3  $\mu$ Ci/ml)를 첨가함으로써 반응을 시작하였다. 반응시작 후 37° C에서 10분간 반응하였고, 1ml의 에탄올에 녹여있는 15% KOH를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 중지시킨 반응액을 65℃에서 30 분간 방치하여 단백질을 분해하였고, 5ml의 페트롤륨 에테르를 첨가하여 10분간 추출하였다. 반응액을 30℃ 방치하여 하층을 얻린 후 상등의 유기용매층을 2ml의 물이 담긴 유리튜브에 옮겼다. 볼텍스(vortex)를 이용하여 세척 후, 1.5ml 상등액을 3ml의 신틸레이션 콕테일(scintillation cocktail)이 담긴 튜브(제조사, cat.No)에 옮겨 베크만 섬광계측기(Beckman scintillation counter; 제조사정보)로 측정하였다.

[0107] 그 결과, 양성대조군인 심바스타틴과 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤 모두 농도 의존적으로 스쿠알렌 합성효소를 저해하는 것을 확인하였으며, 심바스타틴, 멀베로사이드 A 및 옥시레스베라트롤은 10  $\mu$ M 농도에서 음성대조군에 비해 각각  $19.9 \pm 1.1\%$ ,  $59.1 \pm 1.6\%$  및  $38.6 \pm 1.0\%$ 로 스쿠알렌 합성효소가 저해되는 것을 확인하였다. 특히, 어글라이콘 형태인 옥세레스베라트롤이 멀베로사이드 A에 비해 스쿠알렌 합성효소 저해효과가 우수한 것을 확인하였다 (도 5).

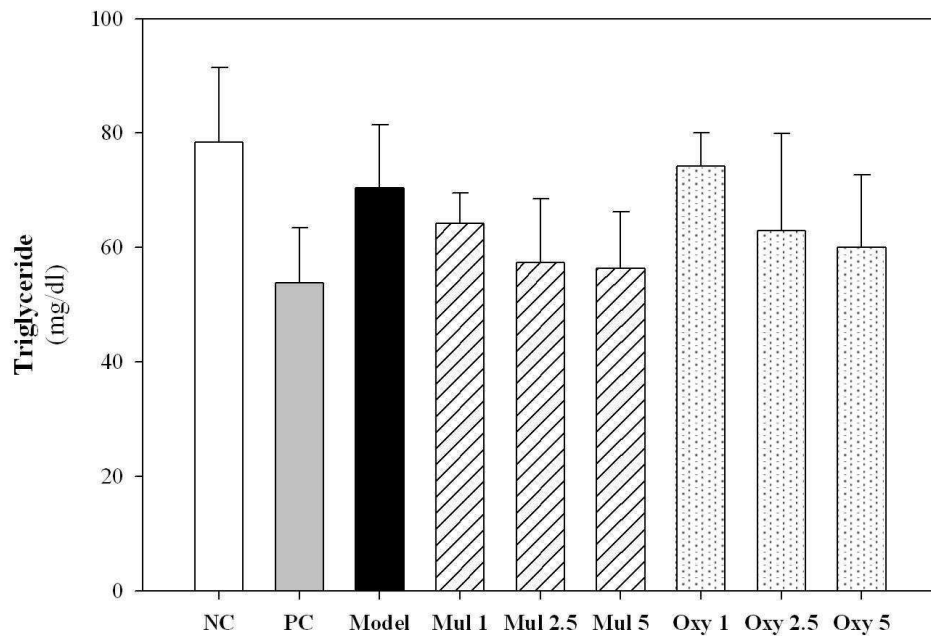
[0108] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

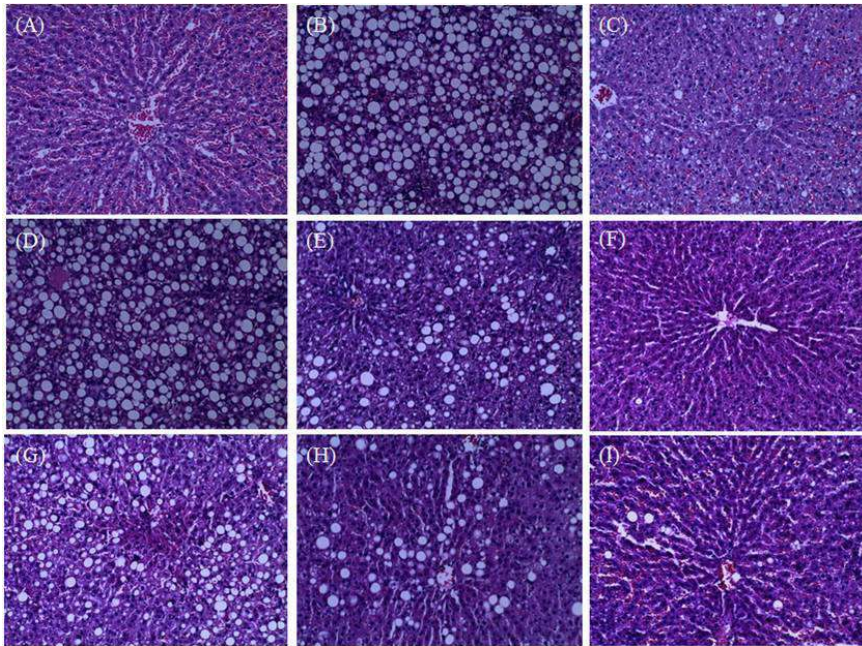
도면1



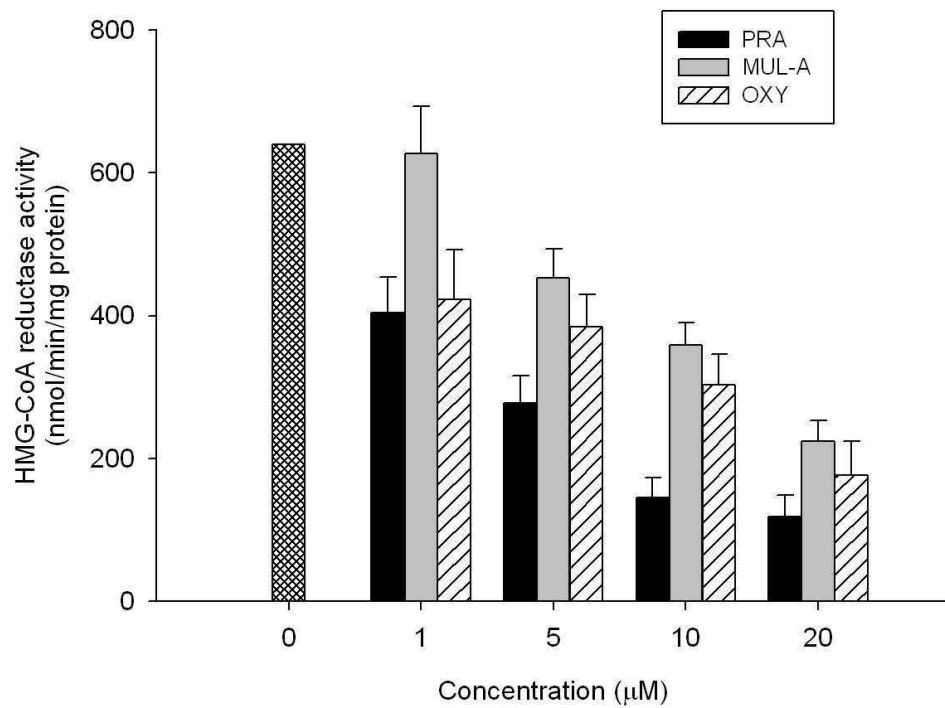
도면2



도면3



도면4



도면5

