(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월04일
(11) 등록번호 10-1672708
(24) 등록일자 2016년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) *A61K 31/09* (2006.01)
A61K 36/537 (2006.01) *B01D 11/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 31/09 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0129495
(22) 출원일자 2015년09월14일
심사청구일자 2015년09월14일
(56) 선행기술조사문헌
CHEN JUAN-HUA 외 7명, Preventive Effects of Folium Perillae Extract on Atherosclerosis Formation in Rabbits, LISHIZHEN MEDICINE AND MATERIA MEDICA RESEARCH, 제19호제11권, 2651~5653쪽, 2008년.*
KR1020060007105 A*
L. GARDUNO 외 6명, Hypolipidaemic activity of α-asarone in mice, JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, 제55권제2호, 161~163쪽, 1997년.*
Kyeong Wan Woo 외 4명, Bull. Korean Chem. Soc., Vol. 35, No. 7, pp. 2151-2154, 2014년.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
강영희
강원도 춘천시 충열로 32, 103동 1102호 (우두동, 동부아파트)
박신혜
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교 생명과학관 8512호 (옥천동)
임순성
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교 생명과학관 8510호 (옥천동)
(74) 대리인
특허법인태동

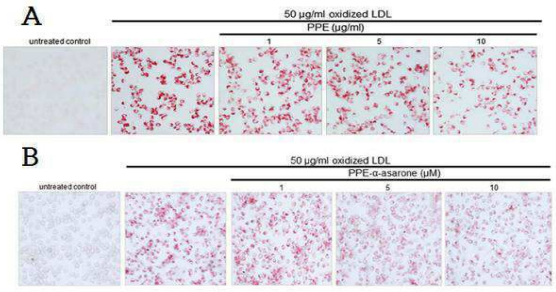
전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 염금희

(54) 발명의 명칭 **차즈기 추출물 또는 알파-아사론을 함유하는 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물 및 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론(α-asarone)을 유효성분으로 함유하는 죽상동맥경화증(atherosclerosis) 개선용 식품 조성물 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론(α-asarone)은 거품세포 형성, 대식세포의 사멸(apoptosis), 소포체 스트레스 및 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸 기전의 억제를 통해 죽상동맥경화증 개선 또는 치료 효과를 발휘한다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A61K 36/537 (2013.01)
B01D 11/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 112085-03-1-SB010
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치식품기술개발
연구과제명 콜레스테롤 대사와 경화성 혈관질환 퇴치를 위한 차즈기 이용 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2012.08.08 ~ 2015.08.07
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

차즈기(*Perilla frutescens*)에 99.5% 메탄올을 가하고 환류추출하여 차즈기 메탄올 추출물을 수득하는 단계 (A);

상기 단계 (A) 후, 물로 현탁시키고, n-헥산을 가하는 단계 (B); 및

상기 단계 (B)로부터 n-헥산 층을 분리하여, 차즈기 n-헥산 분획추출물을 수득하는 단계 (C);를 포함하고,

상기 차즈기 n-헥산 분획추출물은,

거품세포 형성 억제, 콜레스테롤 유출 촉진, 대식세포의 사멸 억제, 소포체 스트레스 억제 및 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸 기전 억제 효능을 증대시키는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화 개선용 식품 조성물의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

차즈기(*Perilla frutescens*)에 99.5% 메탄올을 가하고 환류추출하여 차즈기 메탄올 추출물을 수득하는 단계 (A);

상기 단계 (A) 후, 물로 현탁시키고, n-헥산을 가하는 단계 (B); 및

상기 단계 (B)로부터 n-헥산 층을 분리하여, 차즈기 n-헥산 분획추출물을 수득하는 단계 (C);를 포함하고,

상기 차즈기 n-헥산 분획추출물은,

거품세포 형성 억제, 콜레스테롤 유출 촉진, 대식세포의 사멸 억제, 소포체 스트레스 억제 및 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸 기전 억제 효능을 증대시키는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화 예방 및 치료용 약학 조성물의 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 차즈기 추출물 또는 알파-아사론(α-asarone)을 유효성분으로 함유하는 죽상동맥경화증(atherosclerosis) 개선용 식품 조성물 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 죽상동맥경화증(atherosclerosis)은 세계적으로 높은 사망률을 가지는 질환으로 알려져 있으며, 국내에서도 사망원인 2~3위를 차지할 정도로 위험한 질환이다.

[0004] 죽상동맥경화증은 혈관벽에 지질이 축적되어 점차 혈관을 막아 동맥경화증을 일으키는 증상으로, 지질(콜레스테롤)이 혈관벽에 축적되어 죽종을 형성하면서 시작된다.

[0005] 세포 차원에서 죽상동맥경화증을 발생시키는 세포의 종류는 다양하다. 그 중, 대식세포는 죽상동맥경화증을 유도하는 산화 LDL(low density lipoprotein)의 포식작용을 담당하는 세포이다. 산화 LDL가 대식세포에 포식되면, 지질(콜레스테롤 포함)이 대식세포 내 축적되어 거품세포를 형성하면서 죽상동맥경화증을 일으킨다. 따라서, 죽상동맥경화증의 일차적 예방 차원으로써, 거품세포 내 축적된 지질(콜레스테롤 포함)을 제거하는 것이 매우 중요하다.

[0006] 한편, 죽상동맥경화증을 유발하는 LDL(low density lipoprotein)은 산화되면서 세포독성을 유도하는 다양한 옥시스테롤(oxysterol)을 형성한다. 그 중, 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol)은 LDL이 Cu^{2+}로 산화되면서 나타난다.

[0007] 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol)은 대식세포에 자극을 주어 산화스트레스를 유도함으로써, 세포의 사멸까지 유발한다. 대식세포의 사멸은 죽상동맥경화증의 후기 반응에서 섬유피막(fibrous cap)을 포함하는 죽종의 파열을 유발할 수 있는 반응으로써, 죽상동맥경화증을 심화시키게 된다.

[0008] 따라서, 거품세포 형성의 억제, 산화스트레스의 억제, 대식세포의 사멸 억제는 죽상동맥경화증의 개선 또는 치료를 위한 중요한 요소이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1127675호(등록 일자: 2012.03.09)에는, 열수추출한 후 구연산을 첨가하는 열수추출방법 또는 구연산용액으로 추출하는 구연산추출방법 중에서 선택된 어느 하나의 추출방법으로 제조된 차조기 추출액 및 이를 이용한 음료에 관해 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2013-0121324호(공개 일자: 2013.11.06)에는, 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중 어느 하나를 사용하여 추출한 차즈기 잎 조추출물 또는 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트 중에서 선택되는 어느 하나의 비극성가용추출물을 유효성분으로 포함하는 숙취 해소 조성물에 대해 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 죽상동맥경화증(atherosclerosis) 개선 및 치료 효과가 있는 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론(α-asaron)을 유효성분으로 함유하는 '죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물' 및 '치료용 약학 조성물'을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 차즈기 메탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물을 제공한다.

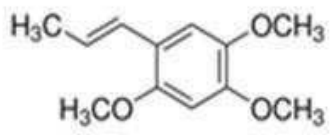
[0014] 차즈기는 소엽, 차조기, 개소엽, 참소엽, 약들깨 등 다양한 명칭으로 불리며, 학명은 페릴라 프루테센스

(*Perilla frutescens*)이다. 차즈기는 우리나라를 포함한 동아시아에 다양하게 분포되어 자라는 꿀풀과 들깨속에 속하는 한해살이풀이며, 부위별로 다양한 효능이 알려져 있다.

[0015] 본 발명의 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 차즈기 메탄올 추출물은 바람직하게 농도가 1~100 ㎍/㎖인 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 1~10 ㎍/㎖인 것이 좋다. 상기 범위를 만족할 시, 거품세포의 형성, 대식세포의 사멸(apoptosis), 소포체 스트레스 및 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸 기전이 효과적으로 억제될 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 알파-아사론(α-asarone)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 알파-아사론은 차즈기로부터 유래한 것을 사용할 수 있다.

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 본 발명의 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 알파-아사론(α-asarone)은 바람직하게 농도가 1~100 μM인 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 1~10 μM인 것이 좋다. 상기 범위를 만족할 시, 거품세포의 형성, 대식세포의 사멸(apoptosis), 소포체 스트레스 및 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸 기전이 효과적으로 억제될 수 있다.

[0020] 본 발명의 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론(α-asarone)은 바람직하게 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물 대비 0.00001~60 중량% 포함되는 것이 좋다. 0.00001 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 60 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.

[0021] 본 발명의 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물은 일 예로, 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜렛, 빵류, 스낵류, 과자류, 사탕, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 유제품류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 한편, 본 발명은 차즈기 메탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 죽상동맥경화증 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 차즈기 메탄올 추출물은 바람직하게 농도가 1~100 ㎍/㎖인 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 1~10 ㎍/㎖인 것이 좋다. 상기 범위를 만족할 시, 거품세포의 형성, 대식세포의 사멸(apoptosis), 소포체 스트레스 및 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸 기전이 상당히 억제될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 알파-아사론(α-asarone)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 죽상동맥경화증 치료용 약학 조성물을 제공한다. 이때, 상기 알파-아사론은 차즈기로부터 유래한 것을 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 죽상동맥경화증 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 알파-아사론(α-asarone)은 바람직하게 농도가 1~100 μM인 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 1~10 μM인 것이 좋다. 상기 범위를 만족할 시, 거품세포의 형성, 대식세포의 사멸(apoptosis), 소포체 스트레스 및 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸 기전이 상당히 억제될 수 있다.

[0027] 본 발명의 죽상동맥경화증 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론(α-asarone)은 바람직하게 약학 조성물 대비 0.00001~60 중량% 포함되는 것이 좋다. 0.00001 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 60 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.

[0028] 한편, 본 발명의 죽상동맥경화증 치료용 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤

조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다.

[0029] 한편, 본 발명의 죽상동맥경화증 치료용 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니멘트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 전제(DECOCTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLSMA), 캅셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 틴크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0030] 한편, 본 발명의 죽상동맥경화증 치료용 약학 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 죽상동맥경화증 치료용 약학 조성물은 유효성분을 기준으로 하였을 때, 1일 0.00001 내지 100 ㎎/㎏(체중)으로 1회 이상 투여 가능하다. 그러나 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 따라 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론(α-asarone)은 거품세포 형성 억제, 대식세포의 사멸(apoptosis)의 억제, 소포체 스트레스 및 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸 기전의 억제를 통해 죽상동맥경화증 개선 또는 치료 효과를 발휘한다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 용매별 차즈기 메탄올 추출물의 박층크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC) 결과이다.

도 2는 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 ^{1}H-NMR 스펙트럼 결과이다.

도 3은 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 ^{13}C-NMR 스펙트럼 결과이다.

도 4는 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 COSY 스펙트럼 결과이다.

도 5는 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 HMBC 스펙트럼 결과이다.

도 6은 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 HMQC 스펙트럼 결과이다.

도 7(A)는 'Oil red O' 염색을 통해 차즈기 메탄올 추출물(PPE)이 거품세포 형성 억제에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.

도 7(B)는 'Oil red O' 염색을 통해 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 거품세포 형성 억제에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.

도 8(A)는 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)이 죽상동맥경화증 완화의 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1에 미치는 영향을 측정한 웨스턴 블롯(western blot) 및 그래프이다.

도 8(B)는 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 죽상동맥경화증 완화의 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1에 미치는 영향을 측정한 웨스턴 블롯(western blot) 및 그래프이다.

도 9(A)는 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)이 콜레스테롤 유출(cholesterol efflux)에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 9(B)는 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 콜레스테롤 유출(cholesterol efflux)에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 10(A)는 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol) 처리시, 시간에 따른 세포 생존을 나타낸 그래프이다.

도 10(B)는 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone) 첨가시, 시간에 따른 세포 생존을 나타낸 그래

프이다.

도 11은 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 'TUNEL assay' 결과 사진이다.

도 12(A)는 산화 LDL 처리시, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 XBP1 발현 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 12(B)는 산화 LDL 처리시, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 XBP1 발현 억제 효과를 나타내는 사진이다.

도 12(C)는 산화LDL 처리시, 'XBP1 splicing'의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과이다. XBP1 splicing은 소포체 스트레스를 통한 XBP1의 활성화를 확인할 수 있는 마커로 상부 밴드(band)는 'unspliced band'이며, 하부 밴드(band)는 'spliced band'이다.

도 12(D)는 산화LDL 처리시, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 'XBP1 splicing' 억제 효과를 나타내는 RT-PCR 결과이다.

도 13(A)는 튜니카마이신(tunicamycin) 처리시, XBP1 발현 그래프이다.

도 13(B)는 튜니카마이신(tunicamycin) 처리시, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 XBP1 발현 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

도 13(C)는 튜니카마이신(tunicamycin) 처리시, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 XBP1 발현 억제 효과를 나타내는 사진이다.

도 14(A)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, IRE1 발현을 나타낸 웨스턴 블롯(western blot) 결과이다.

도 14(B)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 IRE1 발현 억제효과를 나타내는 웨스턴 블롯(western blot) 결과이다.

도 14(C)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 IRE1 발현 억제효과를 나타내는 사진이다.

도 15(A)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 절단된 카스파제12(cleaved caspase12)의 발현 결과이다.

도 15(B)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 전단된 카스파제12(cleaved caspase12) 억제효과를 나타내는 결과이다.

도 15(C)는 베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 카스파제3(caspase3) 및 카스파제3(caspase9) 억제효과를 나타내는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0037] **[제조예 1: 차즈기 메탄올 추출물의 제조]**

[0038] 본 제조예에서는 차즈기 메탄올 추출물을 제조하고자 하였다.

[0039] 차즈기 2 kg을 분쇄하여 99.5% 메탄올 (20 L)로 3회 반복 환류(reflux) 추출하였다. 추출액을 여과한 후에 여액을 회전 감압 농축기를 이용하여 메탄올 추출물을 얻었으며, 하기 실험예에서는 차즈기 메탄올 추출물을 감압 농축한 후, 동결건조하여 사용하였다.

[0041] **[제조예 2: 차즈기로부터 알파-아사론의 분리]**

[0042] **<박층크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)를 이용한 성분 분석>**

[0043] 본 제조예에서는 차즈기로부터 알파-아사론을 분리하고 이를 동정하고자 하였다.

[0044] 상기 제조예 1에서 제조된 차즈기 메탄올 추출물을 물로 현탁시키고, 극성에 따라 'n-헥산(n-Hexane)', '메틸렌클로라이드(Methylene chloride)', '에틸 아세테이트(Ethyl acetate)', 'n-부탄올(n-Buthanol)' 그리고 물(H_2O)층으로 순차적으로 분획을 실시하였다.

[0045] 분획물들은 감압 농축한 후, 동결건조를 실시하여 n-헥산 분획물 40 g, 메틸렌 클로라이드 분획물 25g, 에틸 아세테이트 분획물 22g, n-부탄올 분획물 116g, 물 분획물 27g 을 수득하였다.

[0047] **<활성 분획물로부터 유효성분 도출 및 구조 동정>**

[0048] 상기, n-헥산(n-Hexane) 분획물을 이용하여 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR을 측정하였다.

[0049] ^{1}H-NMR 스펙트럼 측정 결과, δ 3.74 (3H, s, $-OCH_3$), 3.79 (3H, s, $-OCH_3$), 3.79 (3H, s, $-OCH_3$)를 통해 메톡시 피크(methoxy peak)를 관찰할 수 있고, δ 5.76 (1H, dq, *J* = 10.6, 6.8 Hz, H-2'), 6.47 (1H, dq, *J* = 10.6, 1.8Hz, H-1')에서 올레피닉 프로톤 시그날(olefinic proton signal)을 관찰할 수 있으며, δ 6.53 (1H, s, H-3), 6.84 (1H, s, H-6)에서 아로마틱 프로톤 시그날(aromartic proton signal)을 관찰할 수 있었다.

[0050] 또한 H-3' 의 인터그랄(integral)값이 3H에 해당하는 값을 나타내며, 통상적으로 C=C에서 H이 cis(β)의 경우 *J* 값이 6~12Hz 정도에 나타나며 Trans(α)의 경우 J값이 12~18Hz에서 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0051] 확보한 ^{1}H-NMR data의 H-1 '과 H-2' 의 *J*값을 계산한 결과 각각 6.58 (^{1}H, *J* = 16.6, 1.8Hz), 6.12 (^{1}H, *J* = 15.8, 6.6Hz)으로 계산이 되며, 이 정보를 통해 분리 정제한 화합물은 trans(α) 형태의 화합물임을 알 수 있었다 (도 2). 도 2는 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 ^{1}H-NMR 스펙트럼 결과이다.

[0052] 한편, ^{13}C-NMR 스펙트럼 측정 결과, δ 56.3 ($-OCH_3$), 56.5 ($-OCH_3$), 56.7 ($-OCH_3$)를 통해 메톡시 카본 피크(methoxy carbon peak)를 관찰할 수 있었고, δ 197.9 (C-3), 114.5 (C-6), 118.4 (C-5), 142.7 (C-1), 148.9 (C-2), 151.8 (C-4)에서 아로마틱 카본 시그날(aromatic carbon signal)이 관찰되었다 (도 3). 도 3은 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 ^{13}C-NMR 스펙트럼 결과이다.

[0053] 이 외에도 2D-NMR(COSY, HMBC, HMQC)등의 자료들을 통해 각각의 부분구조와 결합 형태를 규명하였다 (도 4 내지 6). 도 4은 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 COSY 스펙트럼 결과이고, 도 5은 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 HMBC 스펙트럼 결과이며, 도 6은 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 HMQC 스펙트럼 결과이다.

[0054] 상기 결과를 종합하여 'molecular formula'를 $C_{12}H_{16}O_3$로 추정하였고, 이것으로부터 불포화도(IHD)를 5로 예측하였으며, 차즈기로부터 분리한 화합물이 알파-아사론(α-asarone)으로 확인 동정되었다.

[0056] **[실험예 1: 거품세포 형성 억제 실험]**

[0057] 본 실험예에서는 지질을 염색할 수 있는 'Oil red O' 염색법을 통해 상기 제조예 1에서 제조된 차즈기 메탄올 추출물(PPE) 및 제조예 2에서 수득한 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 거품세포 형성 억제 효과를 확인하고자 하였다.

[0058] 대식세포는 'mouse macrophage cell line'으로 J774A.1 세포주를 이용해 DMEM + 10% FBS 배지에 37℃, 5% CO_2 배양기(incubator)에서 배양한 후 사용하였다. LDL은 사람의 혈액에서 초고속원심분리를 통해 분리하였고, Cu^{2+} 이온을 이용해 24시간 동안 37℃에서 산화시켜 사용하였다.

[0059] 대식세포에 산화 LDL을 처리하고, 차즈기 메탄올 추출물(PPE) 1, 5, 10 ㎍/㎖ 및 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone) 1, 5, 10 ㎛M을 각각 첨가하였다.

[0060] 그 후, 세포를 4% 포름알데히드(formaldehyde)로 고정하고, 60% 이소프로판올(isopropanol)로 세척한(washing) 후, 'Oil red O' 염색약으로 1시간 동안 염색 후, 증류수(distilled water)로 세척(washing)하였다. 세척 후, 슬라이드 글래스(slide glass)위에 봉입(mounting)하여 광학현미경으로 확인하였다.

[0061] 또한, 염색 정도를 수치화하기 위해 염색 후, 100% 이소프로판올(isopropanol)에 녹여 500 nm의 흡광도에서 수치값을 얻었다.

[0062] 실험결과, 산화 LDL을 처리한 군에서는 빨갛게 염색된 부분이 증가하여 세포 내 지질 축적이 증가한 것으로 나타났고, 차즈기 추추물 및 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)을 첨가한 부위는 염색부위가 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0063] 따라서, 차즈기 메탄올 추출물 및 차즈기 유래 알파-아사론이 거품세포의 형성을 억제하는 것으로 알 수 있었다 (도 7). 도 7(A)는 'Oil red O' 염색을 통해 차즈기 메탄올 추출물(PPE)이 거품세포 형성 억제에 미치는 영향을 나타낸 사진이고, 도 7(B)는 'Oil red O' 염색을 통해 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 거품세포 형성 억제에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.

[0065] **[실험예 2: 콜레스테롤 유출 실험]**

[0066] 본 실험에서는 세포 내 축적된 콜레스테롤을 세포 외부로 유출시켜 죽상동맥경화증을 완화하는 기전에서 대표적인 바이오마커로 사용되는 ABCA1과 ABCG1의 단백질 발현 수준을 확인하고자 하였다.

[0067] 대식세포에 산화 LDL을 처리하고, 차즈기 메탄올 추출물(PPE) 1, 5, 10 ㎍/㎖ 및 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone) 1, 5, 10 μM을 각각 첨가하였다.

[0068] 바이오마커의 단백질 수준을 확인하기 위해 웨스턴 블롯(western blot) 분석법을 이용해 확인하였다. 세포 배양 후, 뤼시스 완충액(lysis buffer)을 이용해 셀 라이세이트(cell lysate)를 실시하고, 로우리(Lowry) 단백질 정량법을 사용해 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE에 전기영동하였다.

[0069] 전기영동 후, SDS-PAGE에 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스막(nitrocellulose membrane)에 옮기고, 특이적 항원-항체 반응을 위해 블록킹(blocking), 일차항체(primary antibody), 이차항체(secondary antibody)를 반응시키고, 'ECL solution'으로 발광시켜 엑스레이 필름(X-ray film)으로 검출하였다.

[0070] 실험결과, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE) 1, 5, 10 ㎍/㎖ 및 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)을 각각 첨가한 군에서 ABCA1과 ABCG1 단백질 발현이 모두 증가하는 것으로 나타났는데, 이로부터 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론이 콜레스테롤의 유출 기전을 활성화시키는 것으로 확인할 수 있었다 (도 8). 도 8(A)는 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)이 죽상동맥경화증 완화의 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1에 미치는 영향을 측정한 웨스턴 블롯(western blot) 및 그래프이고, 도 8(B)는 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 죽상동맥경화증 완화의 바이오마커인 ABCA1과 ABCG1에 미치는 영향을 측정한 웨스턴 블롯(western blot) 및 그래프이다.

[0071] 또한, 실제로 콜레스테롤이 유출되었는지 확인하기 위해, 콜레스테롤 유출 분석(cholesterol efflux assay)을 실시하였다. 콜레스테롤 유출 분석법(cholesterol efflux assay)은 콜레스테롤에 형광을 레이블하고, 유입시킨 후 새로운 배지(media)로 바꿔줌으로써 유출되는 양을 형광흡광도를 측정하는 방법이다.

[0072] 실험 결과, 차즈기 메탄올 추출물(PPE) 1, 5, 10 ㎍/㎖ 및 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone) 1, 5, 10 μM을 처리한 군에서 모두 ABCA1과 ABCG1의 그래프 결과와 유사한 결과가 나온 것을 확인하였다.

[0073] 이로부터, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물 및 차즈기 유래 알파-아사론이 세포에 축적된 콜레스테롤의 세포 외 유출을 촉진하는 것으로 확인할 수 있었다 (도 9). 도 9(A)는 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)이 콜레스테롤 유출(cholesterol efflux)에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 9(B)는 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 콜레스테롤 유출(cholesterol efflux)에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[0075] **[실험예 3: 대식세포 사멸(apoptosis)의 억제]**

[0076] 본 실험예에서는 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 대식세포 사멸 억제에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

[0077] 대표적인 옥시스테롤(oxysterol)인 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입해 사용하였다. 세포에 지질독성을 일으킴으로써 세포의 사멸(apoptosis)을 유발하면서 죽상동맥경화증의 후기 단계에서 중요한 역할을 하는 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol)을 시간대별로 세포에 첨가하여, 18시간부터 세포의 생존율이 70% 정도로 감소하는 것을 확인하였고, 24시간부터는 세포생존율이 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

[0078] 상기의 사전 실험을 통해, 세포의 사멸(apoptosis)이 일어나는 시점을 18시간으로 선정하였고, 그 시간에 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)을 처리한 후, MTT assay를 이용해 세포생존율을 확인하였다. MTT assay는 미토콘드리아의 효소 활성도를 측정함으로써 세포생존을 확인하는 대표적인 방법이다.

[0079] 실험 결과, 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 세포 생존을 회복시키는 것으로 확인할 수 있었다 (도 10). 도 10(A)는 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol) 처리시, 시간에 따른 세포 생존을 나타낸 그래프이고, 도 10(B)는 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone) 첨가시, 시간에 따른 세포 생

존을 나타낸 그래프이다.

[0080] 한편, 사멸(apoptosis)이 일어나면 핵 내 DNA들이 응축 또는 절단되는 특징이 나타나는데, 절단된 DNA의 말단에 형광물질이 끼어들어가면서 사멸 여부를 측정하는 방법인 'TUNEL assay'를 사용하여 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone) 10 μM를 첨가하였을 때, 세포 사멸 개선 여부를 확인하였다.

[0081] 실험 결과, 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol)을 처리한 군에서는 절단된 DNA가 증가하였으나, 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)을 처리한 군에서는 감소하는 것을 확인하였다 (도 11). 도 11은 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 'TUNEL assay' 결과 사진이다.

[0082] 이상과 같은 결과로부터, 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)은 세포생존을 회복시키며, 절단 DNA의 양을 감소시킴으로써 사멸(apoptosis)을 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0084] **[실험예 4: 소포체 스트레스 억제]**

[0085] 본 실험예에서는 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE) 및 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 소포체 스트레스 억제에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

[0086] 소포체 스트레스는 소포체에 있는 반응수용체가 활성화되어 세포사멸과 같은 다양한 요인으로 죽상동맥경화증을 유도하는데, 이때 가장 중요한 전사인자(transcription factor)로서는 'XBP1'이 알려져 있다.

[0087] 따라서, 대식세포에 소포체 스트레스를 직접적으로 유도하는 물질로서 '산화 LDL' 또는 '튜니카마이신(tunicamycin)' 또는 '베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol)'을 각각 처리하고, 차즈기 메탄올 추출물(PPE) 또는 알파-아사론(α-asarone)을 농도별로 처리한 후, 각각의 XBP1 발현을 관찰하였다.

[0088] 또한, 소포체 스트레스가 일어난 것을 확인하기 위해, ERSE(ER stress element)의 프로모토(promotor) 활성도를 측정하였는데, 이를 위해 'dual-luciferase assay'를 실시하였다. 'dual-luciferase assay'는 ERSE 프로모토(promotor)에 형광물질을 붙여 형광발광 정도를 측정하는 방법이다.

[0089] 또한, 각 효능에 적합한 바이오마커의 전사 (transcription) 수준을 확인하기 위해 RT-PCR을 이용해 확인하였다. 세포를 조건에 맞춰 배양 후, 트리졸(trizol)을 이용해 셀 라이세이트(cell lysate)를 하고, RNA를 용출하였다. RNA는 'oligo dT'와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용해 상보적 DNA(cDNA)를 만들고, XBP1 유전자의 프라이머(primer)를 이용해 해당 유전자의 전사 레벨(transcription level)을 확인하였다.

[0091] 산화 LDL 처리군 결과, 죽상동맥경화증의 유도물질로 가장 잘 알려진 산화 LDL은 XBP1의 발현을 증가시켰고, 차즈기 메탄올 추출물(PPE)을 처리한 군에서는 XBP1의 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

[0092] 한편, 활성화된 XBP1은 세포질에서 핵 내로 유입되면서 활성도가 더욱 증가하는데, 산화 LDL을 처리한 군에서는 붉은색으로 보이는 XBP1의 발현이 핵을 염색한 파란색의 'DAPI'와 오버랩(overlap)되어 핑크빛으로 바뀐 부분이 증가하였고, 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)을 처리한 군에서는 감소되었다 (도 12). 도 12(A)는 산화 LDL 처리시, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 XBP1 발현 억제 효과를 나타내는 그래프이고, 도 12(B)는 산화 LDL 처리시, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 XBP1 발현 억제 효과를 나타내는 사진이며, 도 12(C)는 산화LDL 처리시, 'XBP1 splicing'의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과이다. XBP1 splicing은 소포체 스트레스를 통한 XBP1의 활성화를 확인할 수 있는 마커로 상부 밴드(band)는 'unspliced band'이며, 하부 밴드(band)는 'spliced band'이다.

[0093] 또한, 도 12(D)는 산화LDL 처리시, 본 발명의 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 'XBP1 splicing' 억제 효과를 나타내는 RT-PCR 결과이다.

[0094] 한편, 튜니카마이신(tunicamycin) 처리시, 차즈기 메탄올 추출물을 처리한 군에서 XBP1의 단백질 발현과 핵 내로의 유입이 모두 감소하는 것을 확인하였다 (도 13). 도 13(A)는 튜니카마이신(tunicamycin) 처리시, XBP1 발현 그래프이고, 도 13(B)는 튜니카마이신(tunicamycin) 처리시, 본 발명 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 XBP1 발현 억제 효과를 나타내는 그래프이며, 도 13(C)는 튜니카마이신(tunicamycin) 처리시, 본 발명 차즈기 메탄올 추출물(PPE)의 XBP1 발현 억제 효과를 나타내는 사진이다.

[0095] 한편, 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol)을 처리하고, 소포체 스트레스의 반응 수용체 중 하나인 IRE1의 인산화를 확인한 결과, 단백질 발현이 증가하였고, 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)을 처리한 군에서 발현량이 감소하였다 (도 14). 도 14(A)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, IRE1 발현을 나타낸 웨스턴 블롯(western blot) 결과이고, 도 14(B)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 본 발명의 차즈기 유

래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 IRE1 발현 억제효과를 나타내는 웨스턴 블롯(western blot) 결과이며, 도 14(C)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 IRE1 발현 억제효과를 나타내는 사진이다.

[0096] 마지막으로, 'dual-luciferase assay'를 통해 ERSE (ER stress element)의 프로모토(promotor) 활성도를 측정한 결과, 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol)로 증가된 ERSE의 활성이 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)을 처리함으로써 감소하는 것을 확인하였다.

[0097] 이상의 결과로부터, 차즈기 메탄올 추출물 또는 차즈기 유래 알파-아사론은 증가된 소포체 스트레스를 감소시킴으로써 소포체 스트레스로 인한 죽상동맥경화증을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0099] **[실험예 5: 소포체 스트레스로 인한 세포 사멸 억제]**

[0100] 본 실험예에서는 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)이 소포체 막에 존재하고, 소포체 스트레스로 인한 세포사멸을 유도하는 대표적인 바이오마커인 카스파제12(caspase12)의 억제에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

[0101] 대식세포에 소포체 스트레스를 직접적으로 유도하는 물질로 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol)을 처리하고, 차즈기 메탄올 추출물(PPE)을 처리한 후, 카스파제12(caspase12)의 활성을 측정하였다.

[0102] 실험결과, 7베타-하이드록시콜레스테롤(7β-hydroxycholesterol) 처리시 카스파제12(caspase12)의 활성화를 측정할 수 있는 절단된 카스파제12 (cleaved caspase12)의 단백질 발현이 증가하였다. 그러나, 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)을 처리한 군에서는 농도의존적으로 절단된 카스파제12(cleaved caspase12)의 단백질 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 카스파제9(caspase9)과 카스파제3(caspase3)의 활성화도 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone) 처리시 억제되는 것으로 확인할 수 있었다.

[0103] 상기의 결과로부터, 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)은 소포체 스트레스를 통한 세포사멸을 억제하는 것으로 확인할 수 있었다 (도 15). 도 15(A)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 절단된 카스파제12(cleaved caspase12)의 발현 결과이고, 도 15(B)는 7베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 절단된 카스파제12(cleaved caspase12) 억제효과를 나타내는 결과이며, 도 15(C)는 베타-하이드록시콜레스테롤 처리시, 본 발명의 차즈기 유래 알파-아사론(PPE α-asarone)의 카스파제3(caspase3) 및 카스파제9(caspase9) 억제 효과를 나타내는 결과이다.

[0105] **[실시예 1: 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물 제조]**

[0106] 본 실시예에서는 하기와 같이 죽상동맥경화증 개선용 식품 조성물을 제조하였다.

[0108] (1) 선식 제조

[0109] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 준비하였다. 검정콩, 검정깨 및 들깨 각각을 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 후 배전 및 분쇄하여 입도 60메쉬의 분말로 준비하였다. 이후, 현미 30 중량%, 율무 15 중량%, 보리 20 중량%, 찹쌀 9 중량%, 들깨 7 중량%, 검정콩 8 중량%, 검정깨 7 중량%, 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 3 중량%, 영지 0.5 중량% 및 지황 0.5 중량%을 혼합하여 선식을 제조하였다.

[0111] (2) 츄잉껌 제조

[0112] 껌 베이스 20 중량%, 설탕 76.9 중량%, 향료 1 중량%, 물 2 중량% 및 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

[0114] (3) 캔디 제조

[0115] 설탕 60 중량%, 물엿 39.8 중량%, 향료 0.1 중량% 및 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 캔디를 제조하였다.

[0117] (4) 비스킷 제조

[0118] 박력 1급 25.59 중량%, 중력 1급 22.22 중량%, 정백당 4.80 중량%, 식염 0.73 중량%, 포도당 0.78 중량%, 팜쇼트닝 11.78 중량%, 암모니움 1.54 중량%, 중조 0.17 중량%, 중아황산나트륨 0.16 중량%, 쌀가루 1.45 중량%, 비타민 B0.0001 중량%, 비타민 B0.0001 중량%, 밀크향 0.04 중량%, 물 20.6998 중량%, 전지분유 1.16 중량%,

대용분유 0.29 중량%, 제일인산칼슘 0.03 중량%, 살포염 0.29 중량% 및 분무유 7.27 중량%와 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 비스킷을 제조하였다.

[0120] (5) 건강음료 제조

[0121] 꿀 0.26 중량%, 치옥토산아미드 0.0002 중량%, 니코틴산아미드 0.0004 중량%, 염산리보플라빈나트륨 0.0001 중량%, 염산피리독신 0.0001 중량%, 이노시톨 0.001 중량%, 오르트산 0.002 중량%, 물 98.7362 중량% 및 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 건강 음료를 제조하였다.

[0123] (6) 소시지 제조

[0124] 돈육 65.18 중량%, 계육 25 중량%, 전분 3.5 중량%, 대두단백 1.7 중량%, 식염 1.62 중량%, 포도당 0.5 중량% 및 글리세린 1.5 중량%와 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 소시지를 제조하였다.

[0126] (7) 건강보조식품 제조

[0127] 스피루리나 55 중량%, 구아검효소 분해물 10 중량%, 비타민 B염산염 0.01중량%, 비타민 B6 염산염 0.01 중량%, DL-메티오닌 0.23 중량%, 스테아린산 마그네슘 0.7 중량%, 유당 22.2 중량% 및 옥수수전분 1.85 중량%와 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 10 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 정제형 건강보조식품을 제조하였다.

[0129] **[실시예 2: 죽상동맥경화증 예방 및 치료용 약학 조성물 제조]**

[0130] 본 실시예에서는 하기와 같이 죽상동맥경화증 예방 및 치료용 약학 조성물을 제조하였다.

[0132] (1) 산제 제조

[0133] 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 1 g에 유당 2 g을 혼합하고, 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0135] (2) 정제 제조

[0136] 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 100 ㎎, 옥수수전분 100 ㎎, 유당 100 ㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2 ㎎을 혼합한 후 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0138] (3) 캡슐제 제조

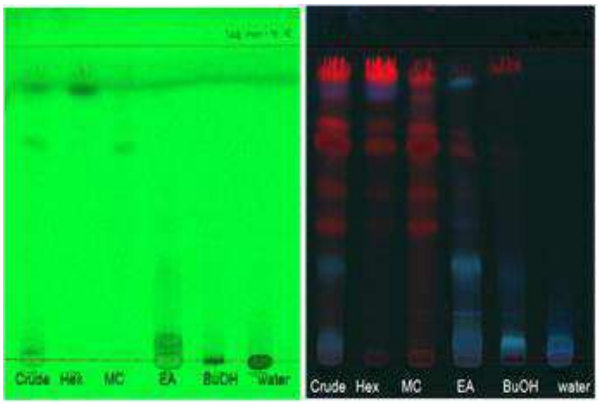
[0139] 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 100 ㎎, 옥수수전분 100 ㎎, 유당 100 ㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2 ㎎을 혼합한 후 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0141] (4) 주사제 제조

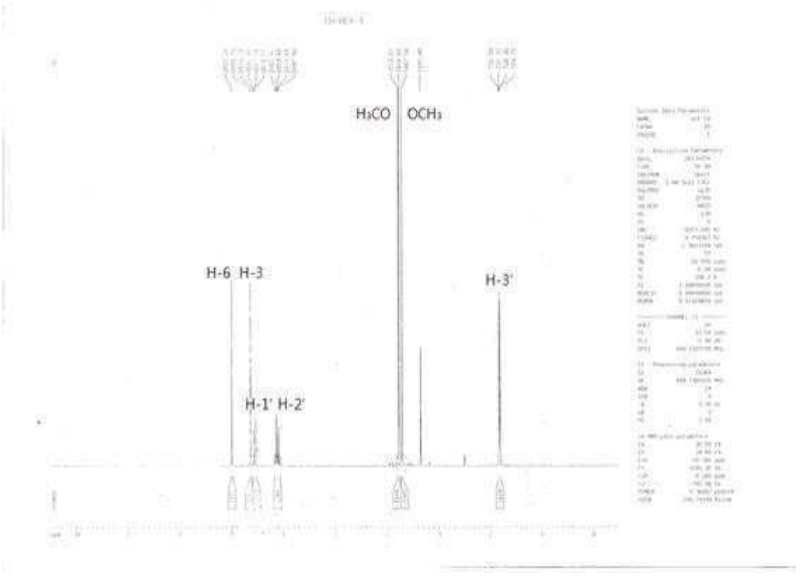
[0142] 차즈기 메탄올 추출물 또는 알파-아사론 100 ㎎에 주사용 증류수 적량을 가하여 용해시키고, pH를 약 7.5로 조절한 다음 2 ㎖ 용량의 앰플에 충진 및 멸균시하여 주사제를 제조하였다.

도면

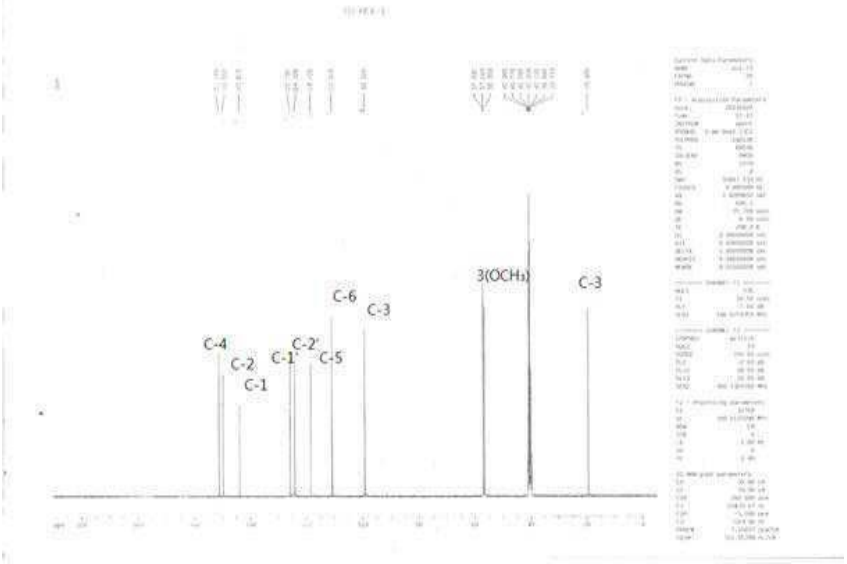
도면1



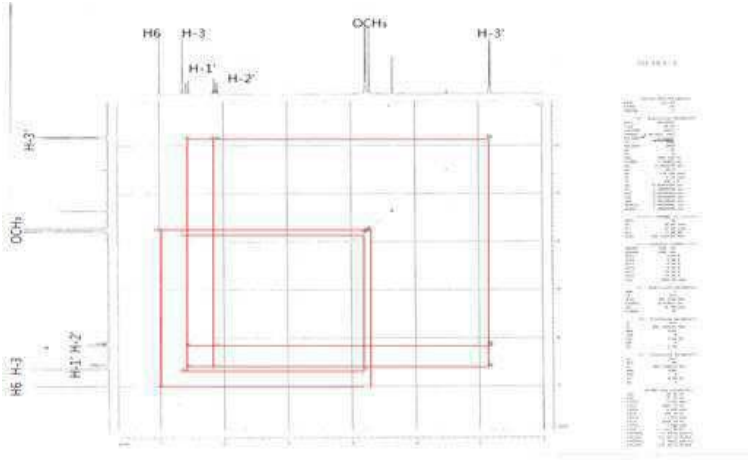
도면2



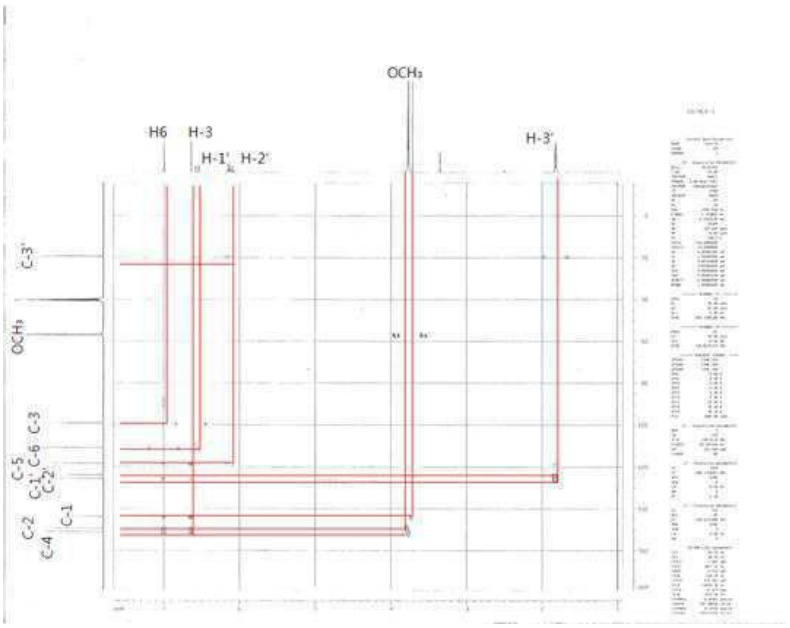
도면3



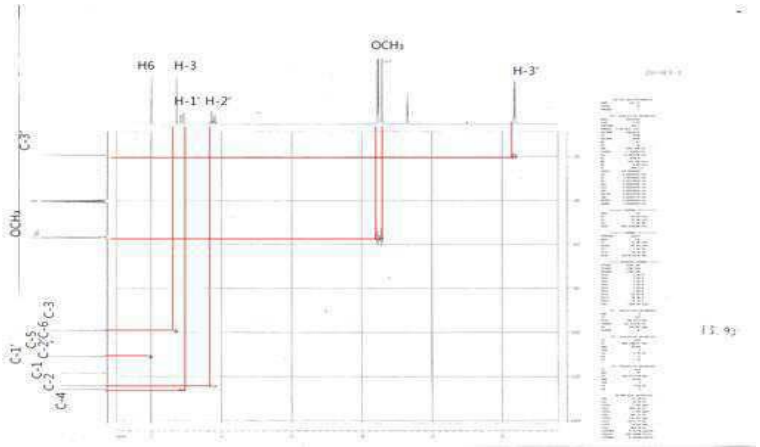
도면4


H6
H-3
H-1'
H-2'
OCH3
H-3'
H-3'
OCH3
H6 H-3
H-1' H-2'

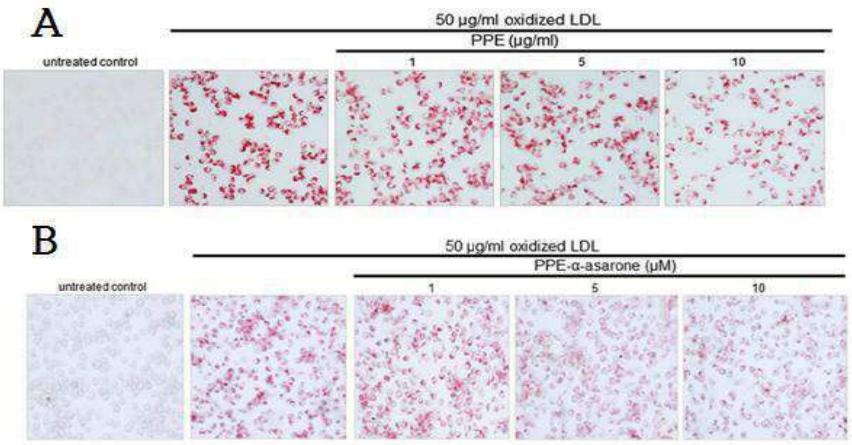
도면5


OCH3
H6
H-3
H-1'
H-2'
H-3'
C-3'
OCH3
C-5
C-6
C-3
C-1'
C-2'
C-2
C-1
C-4

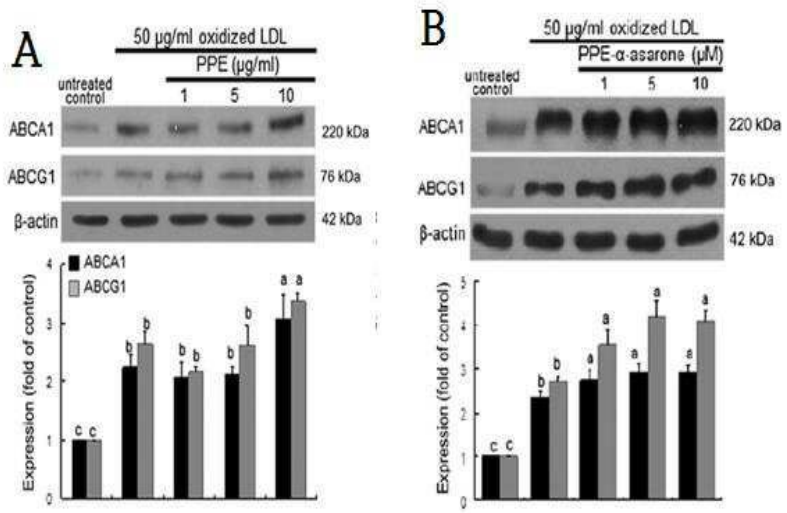
도면6


OCH3
H6
H-3
H-1'
H-2'
H-3'
C-3'
OCH3
C-1'
C-5
C-2'
C-6
C-3
C-2
C-1
C-4

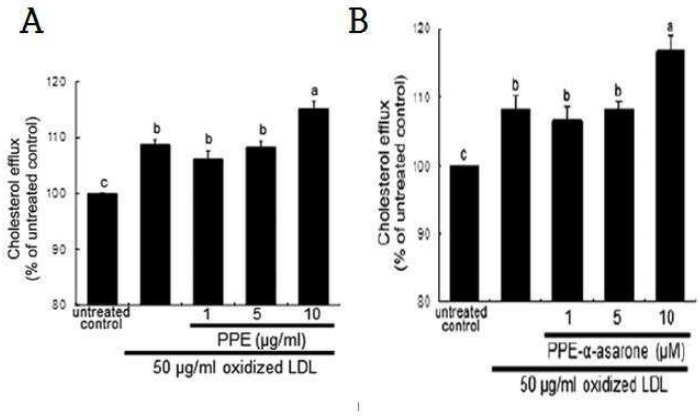
도면7


A
50 μg/ml oxidized LDL
PPE (μg/ml)
untreated control
1
5
10
B
50 μg/ml oxidized LDL
PPE-α-asarone (μM)
untreated control
1
5
10

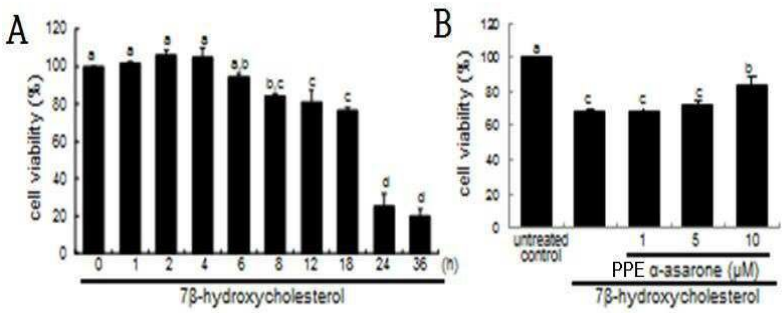
도면8


A
50 μg/ml oxidized LDL
PPE (μg/ml)
untreated control
1
5
10
ABCA1
ABCG1
β-actin
220 kDa
76 kDa
42 kDa
Expression (fold of control)
B
50 μg/ml oxidized LDL
PPE-α-asarone (μM)
untreated control
1
5
10
ABCA1
ABCG1
β-actin
220 kDa
76 kDa
42 kDa
Expression (fold of control)

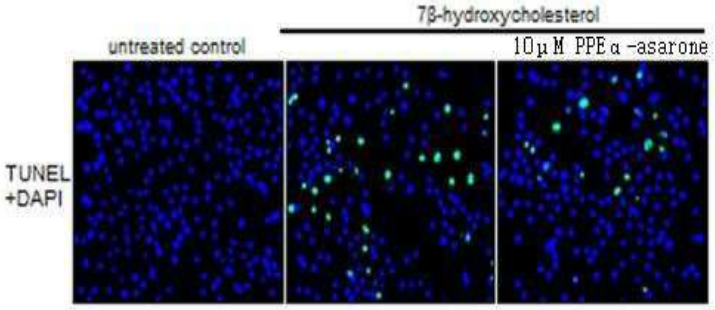
도면9


A
Cholesterol efflux
(% of untreated control)
untreated control
1
5
10
PPE (μg/ml)
50 μg/ml oxidized LDL
B
Cholesterol efflux
(% of untreated control)
untreated control
1
5
10
PPE-α-asarone (μM)
50 μg/ml oxidized LDL

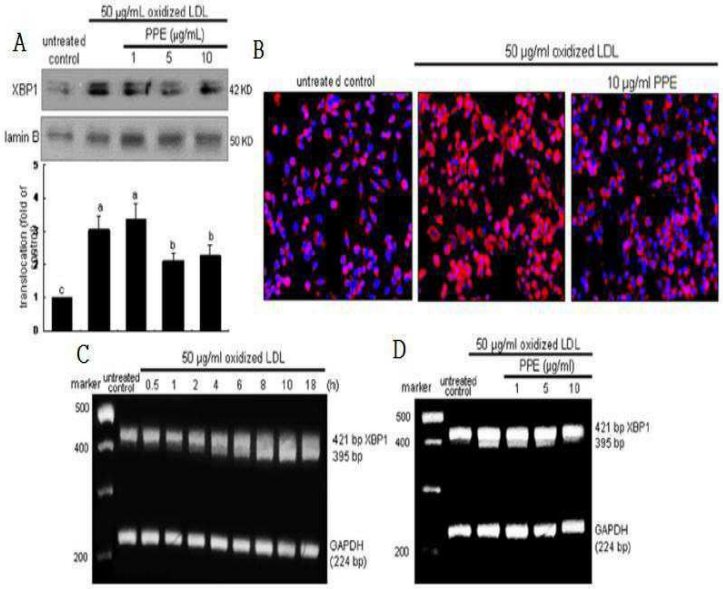
도면10



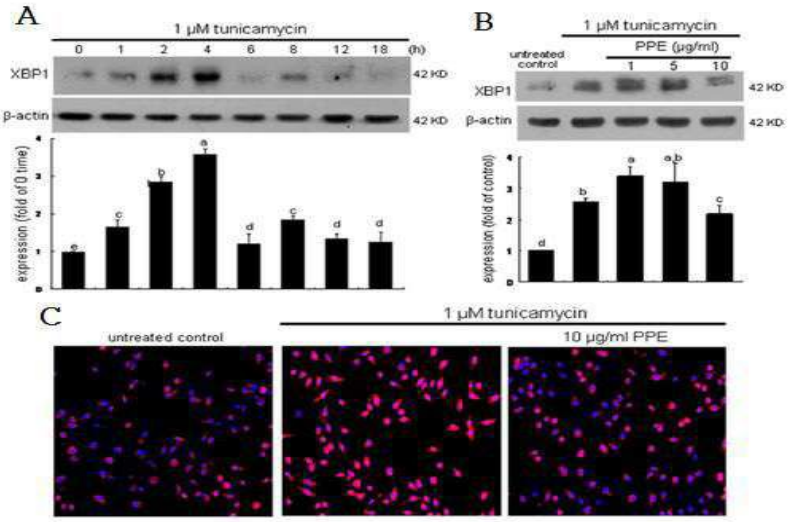
도면11



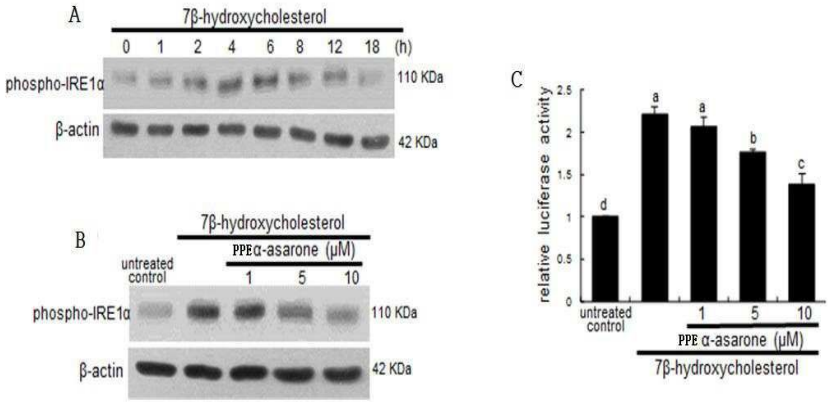
도면12



도면13



도면14



도면15

