

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 9월 29일 (29.09.2016)



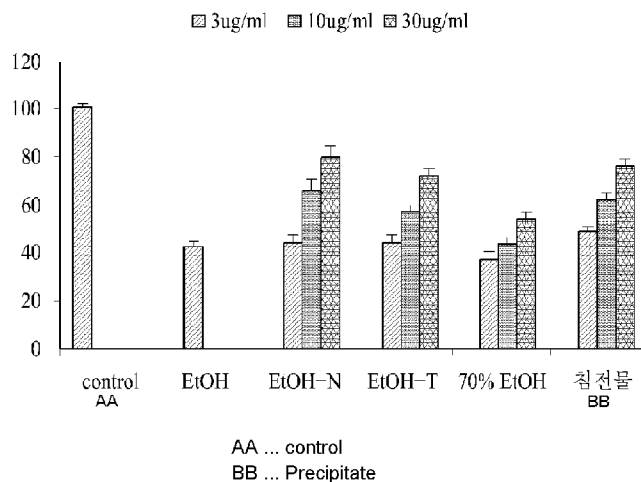
(10) 국제공개번호
WO 2016/153211 A2

- (51) 국제특허분류: A61K 36/752 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002606
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 16일 (16.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0038844 2015년 3월 20일 (20.03.2015) KR
- (71) 출원인: 주식회사 뉴트라팜텍 (NUTRAPHARM TECH CO., LTD) [KR/KR]; 17058 경기도 용인시 처인구 명지로 116, 씨동 18109-2 호(남동, 명지대학교창업보육센터), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 최봉근 (CHOI, Bong Keun); 17153 경기도 용인시 처인구 금령로 173 번길 5, 102 동 102 호 (마평동, 우성아파트), Gyeonggi-do (KR). 서동아 (SUH, Dong A); 37593 경상북도 포항시 북구 천마로 46 번길 34-5 (양덕동), Gyeongsangbuk-do (KR). 서동은 (SUH, Dong Eun); 17024 경기도 용인시 처인구 포곡읍 석성로 850 번길 84 (에버힐스 전원주택), Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 고영갑 (KO, Young Kap); 13487 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 645 번길 12(삼평동) 경기창조경제혁신센터 4층, Gyeonggi-do (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING CITRUS PEEL EXTRACT AND COMPOSITION FOR PREVENTING, ALLEVIATING, OR TREATING LIVER DAMAGE

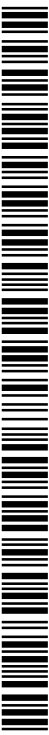
(54) 발명의 명칭 : 감귤류 과피 추출물의 제조방법 및 간 손상 예방, 개선 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: One embodiment of the present invention provides a method for preparing an extract, which has high content of nobiletin and tangeretin, from citrus peel. The method for preparing a citrus peel extract, according to the present invention, is economical since energy consumption in a concentration step is minimized, and meets food standards since water or a low grade alcohol is used as an extraction solvent or a precipitation solvent. In addition, according to the present invention, nobiletin and tangeretin, which are included in the citrus peel extract, can effectively inhibit or alleviate liver damage caused by alcohol, drugs, or cholestasis due to organic synergism. Therefore, the citrus peel extract according to the present invention can be useful as a food and pharmaceutical material.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2016/153211 A2

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명의 일 예는 감귤류 과피로부터 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)의 함량이 높은 추출물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법은 농축 과정에서 에너지의 소모가 최소화되므로 경제적이고 추출 용매 내지 침전 용매로 물 또는 저급 알코올을 사용하기 때문에 식품 규격에 적합하다. 또한, 본 발명에 따른 감귤류 과피 추출물에 포함된 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)은 유기적인 상승 작용에 의해 알코올, 약물 또는 담즙 분비 정체에 의해 유발되는 간 손상을 효과적으로 억제하거나 개선할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 감귤류 과피 추출물은 유용한 식의약 소재로 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 감귤류 과피 추출물의 제조방법 및 간 손상 예방, 개선 또는 치료용 조성물

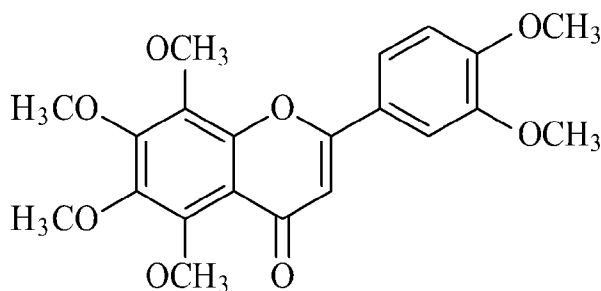
기술분야

- [1] 본 발명은 감귤류 과피 추출물의 제조방법에 관한 것으로서 더 상세하게는 감귤류 과피로부터 폴리메톡시플라보이드 함량이 높은 추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 감귤류 과피 추출물의 의약품으로의 용도 또는 기능성 식품(nutraceuticals)으로의 용도에 관한 것이다.

배경기술

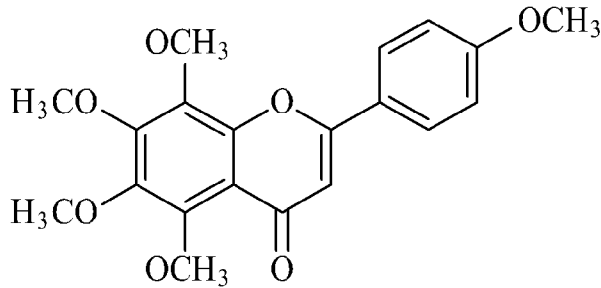
- [2] 합성 화학물질을 식품이나 의약품으로 이용할 때 인체에 지나친 자극을 주거나 다양한 부작용을 발생시키는 등의 문제가 꾸준히 제기되어 왔다. 합성 화학물질의 부작용과 지나친 자극을 줄이기 위해 최근 천연물을 사용한 식품 및 약품 조성물이 다양하게 개발되고 있다. 천연재료는 부작용이 적을 뿐만 아니라 소비자들의 호응이 높아 약품과 화장품의 원료로써 개발가치가 증가하고 있는 추세이다.
- [3] 감귤류 과일은 우리나라에서 많이 생산되는 과일이며 제주도에는 토종 감귤인 진귤(*Citrus sunki hort. ex Tanaka*)을 비롯하여 다양한 품종의 감귤류 과일이 재배되고 있다. 감귤류 과일에 대해서 기존에는 비타민 C의 대명사로만 불리어 왔다. 하지만 감귤에는 몸매 이로운 다른 기능성 물질이 다양하게 있으며, 작은 분자량을 갖는 폴리페놀류 성분인 플라보노이드는 이러한 기능성 물질의 한 종류로서 감귤류 과일에는 60여 가지가 존재한다. 대부분의 플라보노이드 물질은 하이드록시기(-OH)를 가지며 이것이 항산화 등의 기능과 관련 있는 것으로 보인다. 반면, 노빌레틴(nobiletin)은 플라보노이드류 중 다수의 메톡시기(CH₃O-)를 갖는 플라본 그룹에 속하며, 이는 하이드록시기를 갖는 플라본보다 생물학적 활성이 높은 것으로 알려져 있다. 감귤류에서만 발견되는 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)로는 노빌레틴(nobiletin), 탄저레틴(tangeretin), 시넨시틴(sinensitin) 등이 있으며, 이를 통해 천연재료로서 감귤류의 유용성을 알 수 있다.

- [4]



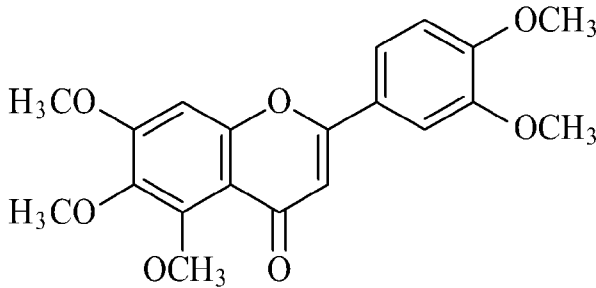
- [5] <노빌레틴 화학 구조식>

[6]



[7] <탄저레틴 화학 구조식>

[8]



[9] <시넨세틴 화학 구조식>

[10] 한편, 상기 폴리메톡시플라보노이드(PMF)는 감귤류의 과피로부터 추출 또는 분획되는데, 폴리메톡시플라보노이드(PMF)의 함량을 높이기 위해 분획 단계에서 대부분 아세트산, 헥산 등과 같은 유기 용매를 사용하기 때문에 감귤류 과피 추출물을 의약품 또는 식품 소재로 사용하기에는 한계가 있다.

[11] 감귤류의 노빌레틴(nobiletin), 탄저레틴(tangeretin) 및 다른 폴리메톡시플라보노이드(PMF)의 생리화학적 활성과 관련하여 항암, 항염증, 면역조절, 신정보호, 기억력손상 회복 효과 작용(Li, R. W., Theriault, A. G., Au, K., Douglas, T. D., Casaschi, A., Kurowska, E. M. and Mukherjee, R., Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters., Life Sciences 79: 365-373, 2006) 등이 보고된 바 있다.

[12] 한편, 폴리메톡시플라보노이드(PMF)의 간 기능 개선 내지 간 손상 억제와 관련하여, 대한민국 공개특허공보 제10-2015-0020001호(선행기술 1)에는 하나의 히드록시기 폴리메톡시플라본 화합물 및 상기 약학적으로 수용할 수 있는 염류 또는 상기 형태에서 임의의 비율로 조제한 물질, 또는 약학적으로 수용할 수 있는 운반체를 포함하는 것을 특징으로 하는 지방간을 치료하는 의약 조성물이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-0883356호(선행기술 2)에는 시넨세틴, 탄저레틴, 3,5,6,7,8,3'4'-헵타메톡시플라본, 또는 5-하이드록시-6,7,8,3',4'-펜타메톡시플라본을 유효성분으로 포함하는 지방간 개선제 약제학적 조성물이 개시되어 있다. 그러나, 선행기술 1 및 선행기술 2에서는 폴리메톡시플라보노이드(PMF)의 효과로 비만 또는 지질대사 이상에 의해 유발되는 지방간에 대해서만 언급하고 있을 뿐 다른 인자에 의해 유발되는

간 손상에 대해서는 언급하고 있지 않다. 또한, 선행기술 3(Satomi Onoue, et al., 2013. Physicochemical and biopharmaceutical characterization of amorphous solid dispersion of nobiletin, a citrus polymethoxylated flavone, with improved hepatoprotective effects. European journal of pharmaceutical sciences. 49, 453-460.)에는 노빌레틴의 간 손상 억제 효과가 개시되어 있다. 그러나, 선행기술 3에는 노빌레틴과 다른 폴리메톡시플라보노이드(PMF)의 병용에 의한 간 손상 억제 효과의 상승에 대해서는 언급하고 있지 않다. 종합적으로 선행기술들에는 서로 다른 폴리메톡시플라보노이드(PMF)의 병용, 특히 노빌레틴과 탄저레틴의 병용이 비만 또는 지질대사 이상 이외의 요인에 의해 유발되는 간 손상에 어떠한 수준으로 작용하는지에 대해 전혀 제시되어 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 발명은 이러한 종래 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 일 목적은 감귤류 과피로부터 특정 폴리메톡시플라보이드 함량이 높은 추출물을 경제적이고 식품 규격에 적합하게 제조하는 방법을 제공하는데에 있다.
- [14] 또한, 본 발명의 다른 목적은 특정 폴리메톡시플라보노이드를 함유하는 감귤류 과피 추출물의 의약적 용도 또는 이에 준하는 용도를 제공하는데에 있다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명의 일 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 감귤류 과피에 알코올 농도가 50~80 중량%인 함수 저급 알코올을 첨가하고 추출하여 추출물이 함유된 추출액을 수득하는 단계; 상기 추출액을 여과하고, 여과된 추출액을 농축하여 농축된 추출액을 수득하는 단계; 및 상기 농축된 추출액에 물 또는 알코올 농도가 30 중량% 이하인 저급 알코올 수용액을 첨가하고 정치하여 추출물을 침전시키고, 이를 분리하여 침전물 형태의 추출물을 수득하는 단계를 포함하는 감귤류 과피 추출물의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법에서 상기 저급 알코올은 탄소 수가 1 내지 4인 알코올이다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법에서 상기 침전물 형태의 추출물은 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)을 포함한다.
- [16] 본 발명의 다른 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 감귤류 과피 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 예에 따른 약학 조성물에서 상기 감귤류 과피 추출물은 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)을 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 약학 조성물은 알코올, 약물, 담즙 분비 이상 또는 담즙 울혈에 의해 유발되는 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 용도로 사용될 수 있다.
- [17] 본 발명의 다른 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 감귤류 과피 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 일 예에

다른 식품 조성물에서 상기 감귤류 과피 추출물은 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)을 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 식품 조성물은 알코올, 약물, 담즙 분비 이상 또는 담즙 울혈에 의해 유발되는 간 손상을 예방 또는 개선하기 위한 용도로 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [18] 본 발명에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법을 사용하는 경우 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)의 함량이 높은 추출물을 수득할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법은 농축 과정에서 에너지의 소모가 최소화되므로 경제적이고 추출 용매 내지 침전 용매로 물 또는 저급 알코올을 사용하기 때문에 식품 규격에 적합하다. 또한, 본 발명에 따른 감귤류 과피 추출물에 포함된 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)은 유기적인 상승 작용에 의해 알코올, 약물 또는 담즙 분비 정체에 의해 유발되는 간 손상을 효과적으로 억제하거나 개선할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 감귤류 과피 추출물은 유용한 식의약 소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 감귤류 과피 추출물이 간 손상 세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- [20] 도 2는 알코올에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 지방 축적에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.
- [21] 도 3은 알코올에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 세포 사멸에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.
- [22] 도 4는 사염화탄소에 의해 만성 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 섬유화에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.
- [23] 도 5는 담관결찰(bile duct ligation, BDL)에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 지방 축적에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.
- [24] 도 6은 담관결찰에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 섬유화에 미치는 영향을 나타낸 사진이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [25] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [26] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [27] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [28] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을

투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

- [29] 본 발명에서 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [30]
- [31] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [32] 본 발명의 일 측면은 감귤류 과피로부터 특정 폴리메톡시플라보이드 함량이 높은 추출물을 경제적이고 식품 규격에 적합하게 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법은 추출물이 함유된 추출액을 수득하는 단계, 농축된 추출액을 수득하는 단계 및 침전물 형태의 추출물을 수득하는 단계를 포함한다. 이하, 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법을 각 단계별로 나누어 설명한다.
- [33] 추출물이 함유된 추출액을 수득하는 단계
- [34] 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법에서 추출물이 함유된 추출액을 수득하는 단계는 감귤류 과피에 함수 저급 알코올을 첨가하고 추출하는 것으로 구성된다. 상기 추출액은 감귤류 과피로부터 추출된 성분, 추출 용매 및 감귤류 과피 잔사를 모두 포함하는 개념이다.
- [35] 상기 감귤류는 과피에 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)이 포함된 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 감귤류는 과피에 포함된 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)의 양을 고려할 때 광귤(Citrus aurantium), 시쿠와사(Citrus depressa), 홍귤(Citrus tachibana), 빈귤(Citrus leiocarpa), 기리귤(Citrus tardiva), 지미강(Citrus succosa), 기주밀감(Citrus kinokuni), 동정귤(Citrus erythroa), 치츄우카이만다린(Citrus deliciosa), 킹(Citrus nobilis), 병감(Citrus reticulata), 편귤(Citrus tangerina), 하나유모(Citrus hanaya), 청귤(Citrus nippokoreana), 진귤(Citrus sunki hort. ex Tanaka) 및 한라봉(Citrus hybrid Shiranuhi)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하고, 광귤(Citrus aurantium) 또는 진귤(Citrus sunki hort. ex Tanaka)인 것이 더 바람직하다.
- [36] 또한, 상기 함수 저급 알코올의 알코올 농도는 감귤류 과피에 포함된 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF), 특히 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)의 추출 수율 및 후술하는 농축 과정에서의 경제성을 고려할 때 50~80 중량%인 것이 바람직하고, 60~80 중량%인 것이 더 바람직하고, 65~75 중량%인 것이 가장 바람직하다. 함수 저급 알코올의 알코올 농도가 50 중량% 미만인 경우 이후의 농축 과정에서 에너지 소모 및 농축 시간이 증가하여 전체 공정의 경제성이 떨어질 염려가 있다. 또한, 함수 저급 알코올의 알코올

농도가 80 중량%를 초과하는 경우 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)의 추출 수율이 현저하게 떨어질 염려가 있다.

- [37] 또한, 상기 저급 알코올은 추출 수율, 감귤류 과피 추출물에 포함된 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)의 분포 및 식품 규격 등을 고려할 때 탄소 수가 1 내지 4인 알코올(예를 들어, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올)인 것이 바람직하고, 에탄올인 것이 더 바람직하다.
- [38] 또한, 상기 추출물이 함유된 추출액을 수득하는 단계에서 함수 저급 알코올의 첨가량은 균일한 추출 및 전체 공정의 경제성을 고려할 때 감귤류 과피의 중량 대비 5배 내지 20배인 것이 바람직하고, 8배 내지 20배인 것이 더 바람직하고 8배 내지 15배인 것이 가장 바람직하다.
- [39] 또한, 상기 추출물이 함유된 추출액을 수득하는 단계에서 추출 온도는 추출 수율 및 전체 공정의 경제성을 고려할 때 바람직하게는 10~30°C이고 더 바람직하게는 15~25°C이다.
- [40] 또한, 상기 추출물이 함유된 추출액을 수득하는 단계에서 추출 시간은 추출 수율 및 전체 공정의 경제성을 고려할 때 바람직하게는 2~10일이고, 더 바람직하게는 3~7일이다.

[41]

[42] 농축된 추출액을 수득하는 단계

- [43] 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법에서 농축된 추출액을 수득하는 단계는 추출물이 함유된 추출액을 여과하고, 여과된 추출액을 농축하는 것으로 구성된다.
- [44] 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법에서 추출물이 함유된 추출액을 여과하기 위한 수단인 식품 분야 내지 추출 분야에서 사용되는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 여과포, 여과지, 세라믹 필터, 멤브레인 등이 있다. 추출물이 함유된 추출액은 여과에 의해 여과된 추출액과 여과 케이크로 분리된다. 이후 여과된 추출액은 상압 농축 또는 감압 농축 등을 통해 소정의 농도로 농축된다.

[45]

[46] 침전물 형태의 추출물을 수득하는 단계

- [47] 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법에서 침전물 형태의 추출물을 수득하는 단계는 농축된 추출액에 물 또는 저급 알코올 수용액을 첨가하고 정치하여 추출물을 침전시키고, 침전된 추출물을 분리하는 것으로 구성된다.
- [48] 상기 침전물 형태의 추출물을 수득하는 단계에서 저급 알코올 수용액의 알코올 농도는 농축된 추출액의 침전 속도, 침전 수율, 침전물의 순도 등을 고려할 때 30 중량% 이하(예를 들어 1~30 중량%)이고, 5~25 중량%인 것이 바람직하고, 10~25 중량%인 것이 더 바람직하다.
- [49] 또한, 상기 저급 알코올은 침전 속도, 침전 수율, 침전물의 순도, 침전물에

포함된 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)의 분포 및 식품 규격 등을 고려할 때 탄소 수가 1 내지 4인 알코올(예를 들어, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올)인 것이 바람직하고, 에탄올인 것이 더 바람직하다.

[50] 또한, 상기 침전물 형태의 추출물을 수득하는 단계에서 물 또는 저급 알코올 수용액의 첨가량은 침전 속도, 침전 수율, 침전물의 순도 등을 고려할 때 농축된 추출액의 중량 대비 3배 내지 12배인 것이 바람직하고, 4배 내지 10배인 것이 더 바람직하고, 4배 내지 8배인 것이 가장 바람직하다.

[51] 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법에서 침전물 형태의 추출물은 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)을 포함하고, 다른 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 침전물 형태의 추출물 내에서 노빌레틴(nobiletin)의 함량은 침전물 형태의 추출물 건조 중량을 기준으로 바람직하게는 25~30 중량%이다. 또한, 상기 침전물 형태의 추출물 내에서 탄저레틴(tangeretin)의 함량은 침전물 형태의 추출물 건조 중량을 기준으로 바람직하게는 20~25 중량%이다. 또한, 상기 침전물 형태의 추출물 내에서 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)을 합한 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)의 함량은 침전물 형태의 추출물 건조 중량을 기준으로 바람직하게는 45~55 중량%이다. 다만, 상기 침전물 형태의 추출물은 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin) 외의 다른 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)를 포함할 수 있으므로, 상기 침전물 형태의 추출물 내에서 모든 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)의 함량은 침전물 형태의 추출물 건조 중량을 기준으로 55 중량%를 초과할 수 있고, 예를 들어 55~65 중량%일 수 있다. 또한, 침전물 형태의 추출물 내에서 노빌레틴(nobiletin) 대 탄저레틴(tangeretin)의 중량비는 추출 원료로 사용한 감귤류의 종류, 추출 용매의 종류, 침전 용매의 종류, 추출 온도 등에 따라 다양한 범위를 가질 수 있으며, 간 손상 억제 내지 간 기능 개선에 대한 노빌레틴과 탄저레틴의 유기적 상호작용 및 상승 효과를 고려할 때 1:0.5 내지 1:1인 것이 바람직하고, 1:0.7 내지 1:0.9인 것이 더 바람직하다.

[52] 본 발명의 일 예에 따른 감귤류 과피 추출물의 제조방법에서 침전된 추출물은 원심분리 등과 같은 다양한 분리 수단에 의해 침전 용매 및 불순물과 분리된다. 이후, 분리된 침전물 형태의 추출물은 건조 과정을 거쳐 분말 형태 또는 과립 형태와 같은 고상의 추출물로 전환된다.

[53]

[54] 본 발명의 다른 측면은 감귤류 과피 추출물의 의약적 용도 또는 이에 준하는 용도(예를 들어, 건강기능식품으로의 용도)에 관한 것이다. 본 발명은 감귤류 과피 추출물의 일 용도로 감귤류 과피 추출물을 유효성분으로 포함하는 알코올, 약물, 담즙 분비 이상 또는 담즙 울혈에 의해 유발되는 간 손상을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 용도의 조성물을 제공한다.

[55] 본 발명의 조성물에서 상기 감귤류 과피 추출물은 노빌레틴(nobiletin) 및

탄저레틴(tangeretin)을 포함하고, 바람직하게는 전술한 감귤류 과피 추출물의 제조방법에 의해 제조된다. 또한, 본 발명의 조성물에서 상기 감귤류 과피 추출물에 존재하는 노빌레틴(nobiletin) 대 탄저레틴(tangeretin)의 중량비는 간 손상 억제 내지 간 기능 개선에 대한 노빌레틴과 탄저레틴의 유기적 상호작용 및 상승 효과를 고려할 때 1:0.5 내지 1:1인 것이 바람직하고, 1:0.7 내지 1:0.9인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명의 조성물에서 감귤류 과피 추출물 건조 중량을 기준으로 노빌레틴(nobiletin)의 함량은 25~30 중량%이고 탄저레틴(tangeretin)의 함량은 20~25 중량%인 것이 바람직하다.

- [56] 또한, 본 발명의 조성물에서 상기 간 손상을 유발하는 알코올은 에탄올이 함유된 주류를 포함한다. 또한, 상기 약물은 간에서 해독하기 어려운 성분을 포함하거나 간 세포의 사멸을 유도하는 성분을 포함하는 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 갑상선기능항진증 치료제(Prophylthiouracil 성분), 무좀약(Ketoconazole 계열), 항결핵제(Isoniazid 계열), 항생제(Amoxicillin 계열), 한약 등을 들 수 있다. 또한, 상기 담즙 분비 이상은 담즙이 과다하게 분비되거나 담즙이 너무 적게 분비되거나 담즙의 흐름이 방해되는 것을 모두 포함하는 개념이며, 바람직하게는 담즙 분비 정체이다. 또한, 본 발명의 조성물에서 상기 간 손상은 간세포 괴사, 지방간, 간 장애, 간염, 간 섬유화 또는 간경변증을 포함하며, 예를 들어 알코올성 지방간, 알코올성 만성 감염, 독성 간 손상, 담즙성 간경변증 등이 있다.
- [57] 또한, 본 발명의 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 첨가제, 식품 조성물(특히 기능성 식품 조성물), 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있고, 조성물 내에서 유효성분인 감귤류 과피 추출물 등의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.
- [58] 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유효성분인 감귤류 과피 추출물의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~99 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 감귤류 과피 추출물 외에 간 손상을 억제하거나 간 기능을 개선하는 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통

사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이라면 크게 제한되지 않으며, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 유효성분을 기준으로 할 때 1 내지 3000 mg/kg이고, 바람직하게는 10 내지 2000 mg/kg이고 더 바람직하게는 20~1000 mg/kg이다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

- [59] 또한, 본 발명에 따른 식품 조성물에서 유효성분인 감귤류 과피 추출물의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~25 중량%, 더 바람직하게는 0.5~10 중량%이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 식품 조성물은 유효성분 외에 식품학적으로 허용 가능한 담체, 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염,

유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분들은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[60]

[61] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[62]

[63] **1. 감귤류 과피 추출물의 제조**

[64] 제조예 1.

[65] 광귤(*Citrus aurantium*) 과피 분말 20g에 함수 에탄올(에탄올 농도 : 70 중량%) 200ml를 첨가하고 실온(약 20±5°C)에서 3일 동안 추출하였다. 이후, 추출액을 여과하여 불용성 성분인 잔사를 제거하였다. 이후, 여과된 추출액을 실온(약 20±5°C) 및 감압 조건하에서 농축하였다. 이후, 농축된 추출액에 물을 농축된 추출액의 약 5배에 해당하는 중량으로 첨가하고 약 24시간 동안 정치하여 추출물을 침전시켰다. 이후, 3000rpm에서 약 3분간 원심분리하여 침전물 형태의 추출물을 수득하였다. 이후, 침전물 형태의 추출물을 건조하여 고상의 감귤류 과피 추출물을 수득하였다.

[66]

[67] 비교제조예 1.

[68] 광귤(*Citrus aurantium*) 과피 분말 20g에 함수 에탄올(에탄올 농도 : 70 중량%) 200ml를 첨가하고 실온(약 20±5°C)에서 3일 동안 추출하였다. 이후, 추출액을 여과하여 불용성 성분인 잔사를 제거하였다. 이후, 여과된 추출액을 실온(약 20±5°C) 및 감압 조건하에서 농축하였다. 이후, 농축된 추출액을 동결건조하여 고상의 감귤류 과피 추출물을 수득하였다.

[69]

[70] 비교제조예 2.

[71] 광귤(*Citrus aurantium*) 과피 분말 20g에 함수 에탄올(에탄올 농도 : 50 중량%) 200ml를 첨가하고 실온(약 20±5°C)에서 3일 동안 추출하였다. 이후, 추출액을 여과하여 불용성 성분인 잔사를 제거하였다. 이후, 여과된 추출액을 실온(약 20±5°C) 및 감압 조건하에서 농축하였다. 이후, 농축된 추출액을 동결건조하여 고상의 감귤류 과피 추출물을 수득하였다.

[72]

[73] 비교제조에 3.

[74] 광귤(*Citrus aurantium*) 과피 분말 20g에 100% 에탄올 200ml를 첨가하고 실온(약 20±5°C)에서 3일 동안 추출하였다. 이후, 추출액을 여과하여 불용성 성분인 잔사를 제거하였다. 이후, 여과된 추출액을 실온(약 20±5°C) 및 감압 조건하에서 농축하였다. 이후, 농축된 추출액을 동결건조하여 고상의 감귤류 과피 추출물을 수득하였다.

[75]

[76] 비교제조에 4.

[77] 광귤(*Citrus aurantium*) 과피 분말 20g에 물 200ml를 첨가하고 약 60°C의 수욕 상에서 3일 동안 추출하였다. 이후, 추출액을 여과하여 불용성 성분인 잔사를 제거하였다. 이후, 여과된 추출액을 실온(약 20±5°C) 및 감압 조건하에서 농축하였다. 이후, 농축된 추출액을 동결건조하여 고상의 감귤류 과피 추출물을 수득하였다.

[78]

[79] **2. 감귤류 과피 추출물에 함유된 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)의 함량 분석**

[80] 제조에 1 및 비교제조에 1 내지 비교제조에 4에서 제조한 고상의 감귤류 과피 추출물에 함유된 노빌레틴(*nobiletin*) 및 탄저레틴(*tangeretin*)의 함량을 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분석하였다. 고속액체크로마토그래피(HPLC) 분석 조건은 다음과 같다.

[81] * 분석 시료 : 감귤류 과피 추출물을 10mg/ml의 농도가 되게 메탄올에 용해하여 준비함

[82] * 2성분계 이동상 : 제1상으로 증류수와 메탄올을 50:50의 부피비로 혼합한 용액을 사용하였고, 제2상으로 100% 메탄올을 사용하였고, 제1상 대 제2상의 부피비를 100:0으로 시작하여 50분에 걸쳐 0:100으로 변화시킨 후 10분간 유지하는 선형 구배 용매 조성법을 사용함

[83] * 검출기 : 215nm 파장으로 고정된 UV detector

[84] 이후, 노빌레틴(*nobiletin*) 및 탄저레틴(*tangeretin*) 표준시약(Wako, JP)을 농도별로 분석하고 피크 면적 값을 기준으로 표준 검량선을 작성하였다. 이후, 표준 검량선을 이용하여 분석 시료에 존재하는 노빌레틴(*nobiletin*) 및 탄저레틴(*tangeretin*)의 함량을 계산하였다.

[85] 하기 표 1에 감귤류 과피 추출물에 함유된 노빌레틴(*nobiletin*) 및 탄저레틴(*tangeretin*)의 함량을 감귤류 과피 추출물 건조 중량을 기준으로 나타내었다.

[86] [표1]

감귤류 과피 추출물 구분	PMF 함량(% , 감귤류 과피 추출물 건조 중량 기준)		
	노빌레틴	탄저레틴	노빌레틴+탄저레 틴
제조예 1	27.5	22	49.5
비교제조예 1	10.3	7.8	18.1
비교제조예 2	12.9	9.7	22.6
비교제조예 3	1.1	0.7	1.8
비교제조예 4	10.7	7.5	18.2

[87] 상기 표 1에서 보이는 바와 같이 제조예 1에서 제조된 감귤류 과피 추출물은 다른 감귤류 과피 추출물에 비해 높은 노빌레틴(nobiletin) 함량 및 탄저레틴(tangeretin) 함량을 보였다. 한편, 100% 에탄올을 추출 용매로 사용하는 경우 감귤류 과피 추출물의 노빌레틴(nobiletin) 함량 및 탄저레틴(tangeretin) 함량이 현저하게 떨어졌고(비교제조예 3의 결과 참조), 열수를 추출 용매로 사용하는 경우 감귤류 과피 추출물의 노빌레틴(nobiletin) 함량 및 탄저레틴(tangeretin) 함량은 70% 함수 에탄올을 추출 용매로 사용하는 경우와 유사하였으나, 농축 과정 시 에너지 소모가 크고 농축 시간도 증가하는 문제점이 발생하였다.

[88]

[89] **3. 간 손상 세포 실험을 통한 감귤류 과피 추출물의 효능 평가**

[90] (1) 실험방법

[91] 한구 세포주은행에서 분양받은 HepG2 세포를 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 이후, 96-well plate에 HepG2 세포를 1×10^4 의 양으로 접종하고 24시간이 지난 후 시료(노빌레틴, 탄저레틴, 제조예 1의 감귤류 과피 추출물, 비교제조예 1의 감귤류 과피 추출물)를 3~30 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고, 6시간이 지난 후 2% 에탄올과 시료를 동시에 처리하였다. 한편, 정상군에는 시료 및 에탄올을 처리하지 않았고, 음성 대조군에는 에탄올만 처리하였다. 에탄올과 시료를 동시에 처리하고 24시간이 지난 후 각 웰에 MTT 시약을 20ml 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰에서 배지를 제거하고 세포에 DMSO 용액을 150ml 첨가하여 세포를 용해시켰다. 이후, ELISA reader를 이용하여 570nm에서의 흡광도를 측정하고, 세포 생존율을 계산하였다.

[92]

[93] (2) 실험결과

[94] 도 1은 감귤류 과피 추출물이 간 손상 세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 1에서 X축의 "control"은 시료 및 에탄올을 처리하지 않은

정상군을 나타내고, "EtOH"는 에탄올만을 처리한 음성 대조군을 나타내고, "EtOH+N"은 노빌레틴과 에탄올을 처리한 실험군을 나타내고, "EtOH+T"는 탄저레틴과 에탄올을 처리한 실험군을 나타내고, "70% EtOH"는 비교제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물과 에탄올을 처리한 실험군을 나타내고 "침전물"은 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물과 에탄올을 처리한 실험군을 나타낸다. 또한, 도 1에서 Y 축의 값은 세포 생존율(%)을 나타낸다. 또한, 도 1에서 세포 생존율은 정상군을 100으로 하고, 이에 대한 상대적인 값으로 나타내었다. 도 1에서 보이는 바와 같이 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 동일 처리 농도를 기준으로 하였을 때 비교제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물에 비해 알코올에 의한 간 세포 사멸을 효과적으로 억제하였다. 한편, 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물에 포함된 노빌레틴과 탄저레틴의 총 함량은 약 50 중량%이므로 감귤류 과피 추출물을 순수한 노빌레틴 또는 순수한 탄저레틴과 동일 농도로 처리하였을 때 간 세포 사멸 억제 효과는 떨어질 것으로 예상되었다. 그러나, 감귤류 과피 추출물에 포함된 노빌레틴과 탄저레틴의 상승 작용 내지 감귤류 과피 추출물에 포함된 다른 폴리메톡시플라보노이드(Polymethoxy flavonoids, PMF)의 영향으로 인해 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 동일 처리 농도를 기준으로 하였을 때 순수한 노빌레틴 또는 순수한 탄저레틴과 유사하거나 우수한 간 세포 사멸 억제 효과를 보였다.

[95]

[96] **3. 알코올에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험을 통한 감귤류 과피 추출물의 효능 평가**

[97] (1) 실험방법

[98] 6-7 주령 수컷 C57BL/6 생쥐를 1주간 순화한 후 실험에 사용하였다. 순화과정 동안 생쥐는 22°C의 온도, 55%의 습도, 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 사육되었고, 사료와 식수는 자유롭게 제공되었다. 순화과정을 거친 생쥐를 5마리씩 6개의 군으로 나누었다. 이후, 정상군에는 증류수를 3일간 1일 1회 5ml/kg의 양으로 경구 투여하고, 이후 에탄올 처리를 하지 않았다. 또한, 에탄올 단독 처리군에는 증류수를 3일간 1일 1회 5ml/kg의 양으로 경구 투여하고, 3시간 후 20%(v/v) 에탄올 수용액을 12시간 간격으로 3회 5g/kg의 양으로 경구 투여하고, 6시간 후에 실험을 종료하였다. 또한, '에탄올+실리마린(Silymarin)' 처리군에는 실리마린(Silymarin)을 3일간 1일 1회 200mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 이후 에탄올 처리군과 동일한 처리를 하였다. 또한, '에탄올+추출물(50)' 처리군에는 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물을 3일간 1일 1회 50mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 이후 에탄올 처리군과 동일한 처리를 하였다. 또한, '에탄올+추출물(100)' 처리군에는 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물을 3일간 1일 1회 100mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 이후 에탄올 처리군과 동일한 처리를 하였다. 또한, '에탄올+추출물(200)'

처리군에는 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물을 3일간 1일 1회 200mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 이후 에탄올 처리군과 동일한 처리를 하였다. 실험 종료 후 부검을 하였다. 부검은 이산화탄소를 이용하여 생취를 마취한 후 진행되었다. 이후, 후대정맥을 통해 혈액을 채취하였고, 간 조직은 검사방법에 맞게 포르말린으로 고정하거나 액체 질소로 급냉하여 추후 실험을 위해 보관하였다.

[99]

[100] (2) 실험결과

[101] 1) 혈액 분석 결과

[102] 채취한 혈액을 원심분리하여 분석 시료를 준비하고, 혈액 분석 장치(모델명 : FuJk Dri-Chem 4000i; 제조사 : Fujifilm, JP)를 이용하여 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase)의 활성과 TG(triglyceride)의 함량을 측정하였다. 하기 표 2는 혈액 분석 결과를 나타낸 것이다.

[103] [표2]

실험군 구분	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG(mg/dL)
정상군	13.6	62.2	95.2
에탄올 단독 처리군	101.6	208.8	184.6
'에탄올+실리마린(Silymarin)' 처리군	22.2	103.6	136.8
'에탄올+추출물(50)' 처리군	77.4	121.8	184.4
'에탄올+추출물(100)' 처리군	48.8	79.0	174.4
'에탄올+추출물(200)' 처리군	21.2	71.2	148.0

[104] 상기 표 2에서 보이는 바와 같이 본 발명의 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 알코올에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 독성 간질환, 만성 간염, 간경변과 같은 간 손상의 보조 치료제로 사용되는 실리마린과 유사한 간 손상 억제 효과 또는 간 기능 개선 효과를 나타내었다.

[105]

[106] 2) 간 조직의 지방 축적 수준 분석

[107] 간 조직을 10% 인산 완충 포르말린 용액으로 고정하고, 약 5 μ m 두께로 절편하여 시편을 제작하였다. 이후, 시편을 오일 레드 오(oil red O) 용액으로 염색하고 간 조직의 지방 축적 수준을 분석하였다. 도 2는 알코올에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 지방 축적에 미치는 영향을 나타낸 사진이다. 도 2에서 "A"는 정상군을 나타내고, "B"는 에탄올 단독 처리군을 나타내고, "C"는 '에탄올+실리마린(Silymarin)' 처리군을 나타내고, "D"는 '에탄올+추출물(50)' 처리군을 나타내고, "E"는 '에탄올+추출물(100)' 처리군을 나타내고, "F"는 '에탄올+추출물(200)' 처리군을 나타내고,

나타낸다. 도 2에서 보이는 바와 같이 본 발명의 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 실리마린과 유사한 간 조직의 지방 축적 억제 효과를 나타내었다.

[108]

[109] 3) 간 조직의 세포 사멸 수준 분석

[110] 간 조직을 10% 인산 완충 포르말린 용액으로 고정하고, 약 5 μ m 두께로 절편하여 시편을 제작하였다. 이후, 세포 사멸 검출 키트(모델명 : ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit; 제조사 : Milipore, USA)를 이용하여 TUNEL assay로 간 조직의 세포 사멸 정도를 측정하였다. 도 3은 알코올에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 세포 사멸에 미치는 영향을 나타낸 사진이다. 도 3에서 X축의 "Normal"은 정상군을 나타내고, "0"은 에탄올 단독 처리군을 나타내고, "50"은 '에탄올+추출물(50)' 처리군을 나타내고, "100"은 '에탄올+추출물(100)' 처리군을 나타내고, "200"은 '에탄올+추출물(200)' 처리군을 나타낸다. 도 3에서 보이는 바와 같이 본 발명의 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 농도 의존적으로 간 조직의 세포 사멸을 억제하였다.

[111]

[112] 4. 사염화탄소(CCl₄)에 의해 만성 간 손상이 유도된 모델동물 실험을 통한 감귤류 과피 추출물의 효능 평가

[113] (1) 실험방법

[114] 6-7 주령 수컷 ICR 생쥐를 1주간 순화한 후 실험에 사용하였다. 순화과정 동안 생쥐는 22°C의 온도, 55%의 습도, 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 사육되었고, 사료와 식수는 자유롭게 제공되었다. 순화과정을 거친 생쥐를 6마리씩 5개의 군으로 나누었다. 이후, 정상군을 제외하고 나머지 군에 20% 사염화탄소(vehicle : olive oil)를 1주당 2회의 횟수로 총 4주간 1ml/kg의 용량으로 복강 내 투여하여 간 독성을 유발하였다. 이후, 정상군 및 사염화탄소 단독 처리군에는 증류수를 4주간 1일 1회 경구 투여하고, 6시간 후에 실험을 종료하였다. 또한, '사염화탄소+실리마린(Silymarin)' 처리군에는 실리마린(Silymarin)을 4주간 1일 1회 200mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 6시간 후에 실험을 종료하였다. 또한, '사염화탄소+추출물(50)' 처리군에는 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물을 4주간 1일 1회 50mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 6시간 후에 실험을 종료하였다. 또한, '사염화탄소+추출물(200)' 처리군에는 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물을 4주간 1일 1회 200mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 6시간 후에 실험을 종료하였다. 실험 종료 후 부검을 하였다. 부검은 이산화탄소를 이용하여 생쥐를 마취한 후 진행되었다. 이후, 후대정맥을 통해 혈액을 채취하였고, 간 조직은 검사방법에 맞게 포르말린으로 고정하거나 액체 질소로 급냉하여 추후 실험을 위해 보관하였다.

[115]

[116] (2) 실험결과

[117] 1) 혈액 분석 결과

[118] 채취한 혈액을 원심분리하여 분석 시료를 준비하고, 혈액 분석 장치(모델명 : FuJk Dri-Chem 4000i; 제조사 : Fujifilm, JP)를 이용하여 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase)의 활성을 측정하였다. 하기 표 3은 혈액 분석 결과를 나타낸 것이다.

[119] [표3]

실험군 구분	ALT(U/L)	AST(U/L)
정상군	23	85
사염화탄소 단독 처리군	234	211
'사염화탄소+실리마린(Silymarin)' 처리군	24	97
'사염화탄소+추출물(50)' 처리군	87	184
'사염화탄소+추출물(200)' 처리군	65	144

[120] 상기 표 3에서 보이는 바와 같이 본 발명의 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 농도 의존적으로 간 손상을 억제하였다.

[121]

[122] 2) 간 조직의 섬유화 수준 분석

[123] 간 조직을 10% 인산 완충 포르말린 용액으로 고정하고, 약 5 μ m 두께로 절편하여 시편을 제작하였다. 이후, 시편을 Haematoxylin and eosin(H&E) 용액으로 염색하고 간 조직의 섬유화 수준을 분석하였다. 도 4는 사염화탄소에 의해 만성 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 섬유화에 미치는 영향을 나타낸 사진이다. 도 4에서 "A"는 정상군을 나타내고, "B"는 사염화탄소 단독 처리군을 나타내고, "C"는 '사염화탄소+실리마린(Silymarin)' 처리군을 나타내고, "D"는 '사염화탄소+추출물(50)' 처리군을 나타내고, "E"는 '사염화탄소+추출물(200)' 처리군을 나타낸다. 도 4에서 보이는 바와 같이 본 발명의 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 농도 의존적으로 간 조직의 섬유화를 억제하였다.

[124]

[125] 5. 담관결찰(bile duct ligation, BDL)에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험을 통한 감귤류 과피 추출물의 효능 평가

[126] (1) 실험방법

[127] 6-7 주령 수컷 ICR 생쥐를 1주간 순화한 후 실험에 사용하였다. 순화과정 동안 생쥐는 22 $^{\circ}$ C의 온도, 55%의 습도, 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 사육되었고, 사료와 식수는 자유롭게 제공되었다. 순화과정을 거친 생쥐를 7마리씩 5개의 군으로 나누었다. 이후, 모든 군의 개체를 졸레틸(Zoletil)로 마취하였다. 이후, 정상군의 개체에 대해서는 정중선

절개 후 탐색적 개복술만을 실시한 뒤 봉합하였다. 반면, 정상군을 제외한 나머지 군의 개체에 대해서는 개복 후 위를 견인하여 총담관을 확보하고 이중 결찰 후 총담관을 절단하였다. 수술에서 회복된 후, 정상군 및 담관결찰 단독 처리군에는 증류수를 4주간 1일 1회 경구 투여하고, 3시간 후에 실험을 종료하였다. 또한, '담관결찰+실리마린(Silymarin)' 처리군에는 실리마린(Silymarin)을 4주간 1일 1회 200mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 3시간 후에 실험을 종료하였다. 또한, '담관결찰+추출물(50)' 처리군에는 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물을 4주간 1일 1회 50mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 3시간 후에 실험을 종료하였다. 또한, '담관결찰+추출물(200)' 처리군에는 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물을 4주간 1일 1회 200mg/kg의 양으로 경구 투여하고, 3시간 후에 실험을 종료하였다. 실험 종료 후 부검을 하였다. 부검은 이산화탄소를 이용하여 생쥐를 마취한 후 진행되었다. 이후, 후대정맥을 통해 혈액을 채취하였고, 간 조직은 검사방법에 맞게 포르말린으로 고정하거나 액체 질소로 급냉하여 추후 실험을 위해 보관하였다.

[128]

[129] (2) 실험결과

[130] 1) 혈액 분석 결과

[131] 채취한 혈액을 원심분리하여 분석 시료를 준비하고, 혈액 분석 장치(모델명 : FuJk Dri-Chem 4000i; 제조사 : Fujifilm, JP)를 이용하여 ALT(alanine aminotransferase), AST(aspartate aminotransferase) 및 GGT(γ -glutamyl transferase)의 활성과 TCHO(total cholesterol) 및 TBIL(total bilirubin)의 함량을 측정하였다. 하기 표 4는 혈액 분석 결과를 나타낸 것이다.

[132] [표4]

실험군 구분	ALT(U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)	TCHO(mg/dL)	TBIL(mg/dL)
정상군	23.0	84.8	11.1	139.0	1.14
BDL 단독 처리군	507.7	604.0	31.5	239.7	17.85
'BDL+실리마린' 처리군	375.2	452.2	22.5	134.1	15.5
'BDL+추출물(50)' 처리군	320.2	418.6	32.6	296.0	18.1
'BDL+추출물(200)' 처리군	310.4	391.6	19.4	174.8	14.6

[133] * BDL : 담관결찰

[134] 상기 표 4에서 보이는 바와 같이 본 발명의 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 담관결찰(bile duct ligation, BDL)에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 실리마린과 유사하거나 더 우수한 간 손상 억제 효과 또는 간 기능

개선 효과를 나타내었다.

[135]

[136] 2) 간 조직의 지방 축적 수준 분석

[137] 간 조직을 10% 인산 완충 포르말린 용액으로 고정하고, 약 5 μ m 두께로 절편하여 시편을 제작하였다. 이후, 시편을 오일 레드 오(oil red O) 용액으로 염색하고 간 조직의 지방 축적 수준을 분석하였다. 도 5는 담관결찰(bile duct ligation, BDL)에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 지방 축적에 미치는 영향을 나타낸 사진이다. 도 5에서 "A"는 정상군을 나타내고, "B"는 담관결찰 단독 처리군을 나타내고, "C"는 '담관결찰+추출물(50)' 처리군을 나타내고, "D"는 '담관결찰+추출물(200)' 처리군을 나타낸다. 도 5에서 보이는 바와 같이 본 발명의 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 농도 의존적으로 간 조직의 지방 축적을 억제하였다.

[138]

[139] 3) 간 조직의 섬유화 수준 분석

[140] 간 조직을 10% 인산 완충 포르말린 용액으로 고정하고, 약 5 μ m 두께로 절편하여 시편을 제작하였다. 이후, 시편을 Haematoxylin and eosin(H&E) 용액으로 염색하고 간 조직의 섬유화 수준을 분석하였다. 도 6은 담관결찰에 의해 간 손상이 유도된 모델동물 실험에서 감귤류 과피 추출물이 간 조직의 섬유화에 미치는 영향을 나타낸 사진이다. 도 6에서 "A"는 정상군을 나타내고, "B"는 담관결찰 단독 처리군을 나타내고, "C"는 '담관결찰+추출물(50)' 처리군을 나타내고, "D"는 '담관결찰+추출물(200)' 처리군을 나타낸다. 도 6에서 보이는 바와 같이 본 발명의 제조예 1에서 제조한 감귤류 과피 추출물은 농도 의존적으로 간 조직의 섬유화를 억제하였다.

[141]

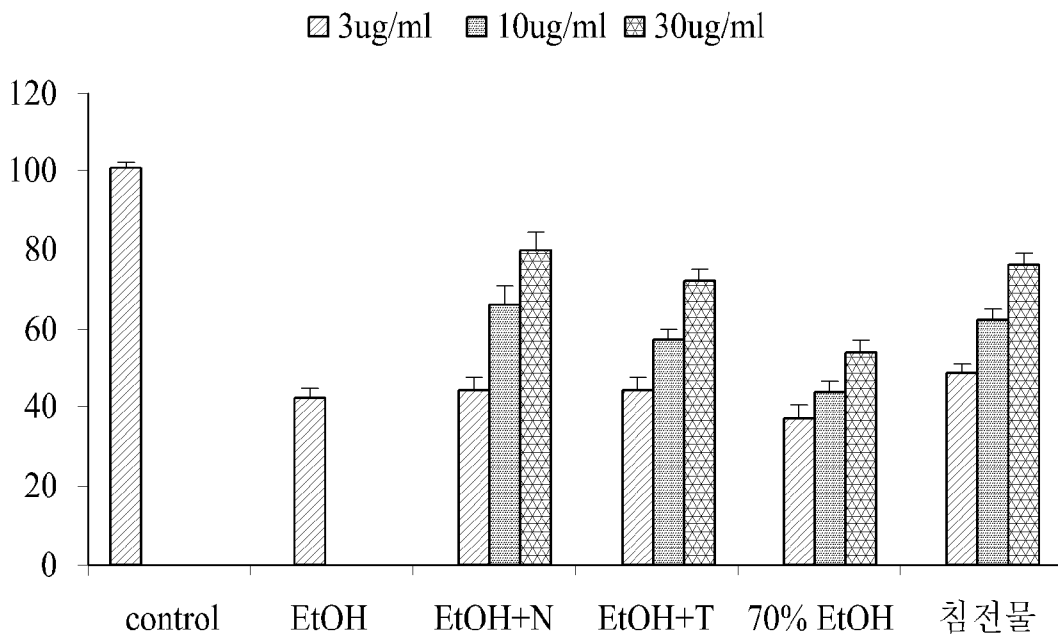
[142] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

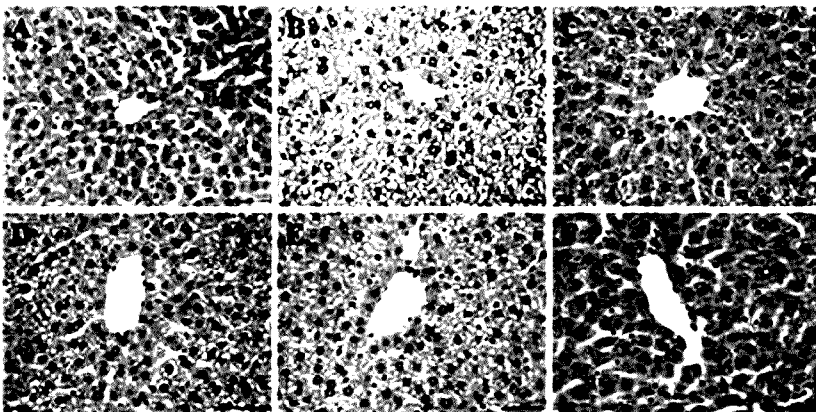
- [청구항 1] 감귤류 과피에 알코올 농도가 50~80 중량%인 함수 저급 알코올을 첨가하고 추출하여 추출물이 함유된 추출액을 수득하는 단계; 상기 추출액을 여과하고, 여과된 추출액을 농축하여 농축된 추출액을 수득하는 단계; 및
상기 농축된 추출액에 물 또는 알코올 농도가 30 중량% 이하인 저급 알코올 수용액을 첨가하고 정치하여 추출물을 침전시키고, 이를 분리하여 침전물 형태의 추출물을 수득하는 단계를 포함하고, 상기 저급 알코올은 탄소 수가 1 내지 4인 알코올이고, 상기 침전물 형태의 추출물은 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)을 포함하는 것을 특징으로 하는 감귤류 과피 추출물의 제조방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 감귤류는 광귤(*Citrus aurantium*), 시쿠와사(*Citrus depressa*), 홍귤(*Citrus tachibana*), 빈귤(*Citrus leiocarpa*), 기리귤(*Citrus tardiva*), 지미강(*Citrus succosa*), 기주밀감(*Citrus kinokuni*), 동정귤(*Citrus erythrosa*), 치츄우카이만다린(*Citrus deliciosa*), 킹(*Citrus nobilis*), 병감(*Citrus reticulata*), 편귤(*Citrus tangerina*), 하나유모(*Citrus hanaya*), 청귤(*Citrus nippokoreana*), 진귤(*Citrus sunki hort. ex Tanaka*) 및 한라봉(*Citrus hybrid Shiranuhi*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 감귤류 과피 추출물의 제조방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올인 것을 특징으로 하는 감귤류 과피 추출물의 제조방법.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 추출액을 수득하는 단계에서 함수 저급 알코올의 첨가량은 감귤류 과피의 중량 대비 5배 내지 20배인 것을 특징으로 하는 감귤류 과피 추출물의 제조방법.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 추출액을 수득하는 단계에서 추출 온도는 10~30°C이고 추출 시간은 2~10일인 것을 특징으로 하는 감귤류 과피 추출물의 제조방법.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 침전물 형태의 추출물을 수득하는 단계에서 물 또는 저급 알코올 수용액의 첨가량은 농축된 추출액의 중량 대비 3배 내지 12배인 것을 특징으로 하는 감귤류 과피 추출물의 제조방법.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 침전물 형태의 추출물 건조 중량을 기준으로 노빌레틴(nobiletin)의 함량은 25~30 중량%이고 탄저레틴(tangeretin)의 함량은 20~25 중량%인 것을 특징으로 하는 감귤류 과피 추출물의 제조방법.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 침전물 형태의 추출물 건조 중량을 기준으로 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)을 합한 함량은 45~55 중량%인

- 것을 특징으로 하는 감귤류 과피 추출물의 제조방법.
- [청구항 9] 감귤류 과피 추출물을 유효성분으로 포함하고,
상기 감귤류 과피 추출물은 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)을 포함하고,
알코올, 약물, 담즙 분비 이상 또는 담즙 울혈에 의해 유발되는 간 손상을 예방 또는 치료하기 위한 용도의 약학 조성물.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 감귤류 과피 추출물에 존재하는
노빌레틴(nobiletin) 대 탄저레틴(tangeretin)의 중량비는 1:0.5 내지 1:1인
것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 11] 제 9항에 있어서, 상기 감귤류 과피 추출물은 제 1항 내지 제 8항 중 어느
한 항의 방법으로 제조된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 12] 감귤류 과피 추출물을 유효성분으로 포함하고,
상기 감귤류 과피 추출물은 노빌레틴(nobiletin) 및 탄저레틴(tangeretin)을 포함하고,
알코올, 약물, 담즙 분비 이상 또는 담즙 울혈에 의해 유발되는 간 손상을 예방 또는 개선하기 위한 용도의 식품 조성물.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 감귤류 과피 추출물에 존재하는
노빌레틴(nobiletin) 대 탄저레틴(tangeretin)의 중량비는 1:0.5 내지 1:1인
것을 특징으로 하는 식품 조성물.
- [청구항 14] 제 12항에 있어서, 상기 감귤류 과피 추출물은 제 1항 내지 제 8항 중 어느
한 항의 방법으로 제조된 것을 특징으로 하는 식품 조성물.
- [청구항 15] 제 12항에 있어서, 상기 감귤류 과피 추출물 건조 중량을 기준으로
노빌레틴(nobiletin)의 함량은 25~30 중량%이고 탄저레틴(tangeretin)의
함량은 20~25 중량%인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

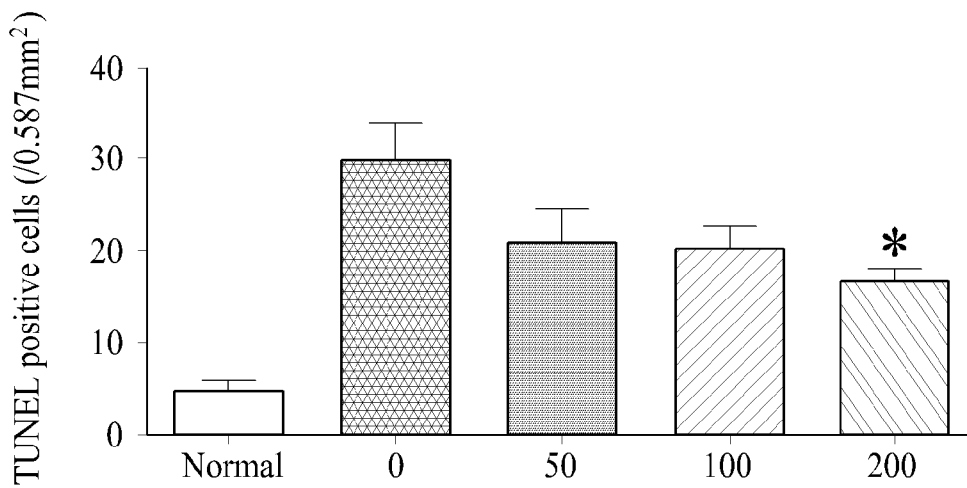
[도1]



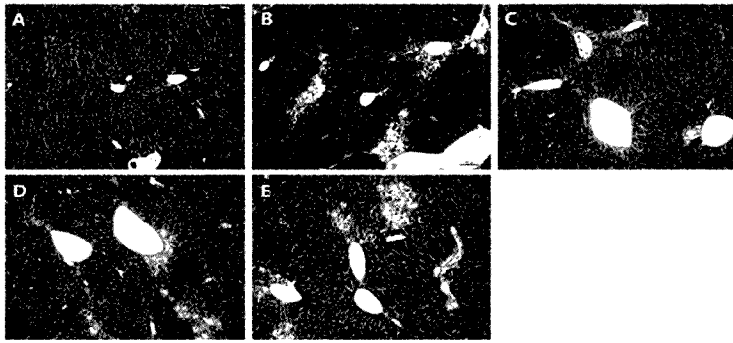
[도2]



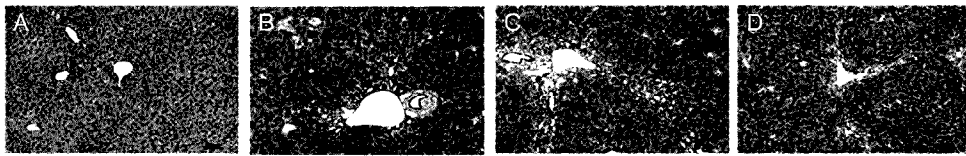
[도3]



[도4]



[도5]



[도6]

