



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0112147
(43) 공개일자 2014년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0026058
(22) 출원일자 2013년03월12일
심사청구일자 2013년03월12일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
정혜광
대전 유성구 반석서로 98, 609동 1102호 (반석동, 반석마을6단지아파트)
황용필
경상남도 진주시 가호로 26 가좌주공 2단지 208동 1003호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
백경업

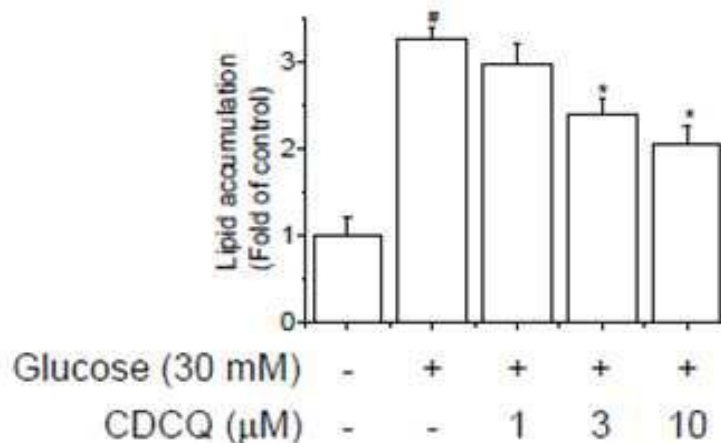
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 지방간 모델 세포에서 지방산, 콜레스테롤 및 트리글리세리드의 합성을 억제하는 효과가 우수하고, 지방 생성 억제와 관련이 있는 AMPK의 활성을 높이며, 지방산 합성의 전사인자인 SREBP-1 및 FAS의 활성을 억제하는 효과가 뛰어나기에, 지방간 또는 비만의 치료제로서 용이하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최재호

대전광역시 유성구 봉명동 자연시티빌 640-7 707
호

김형균

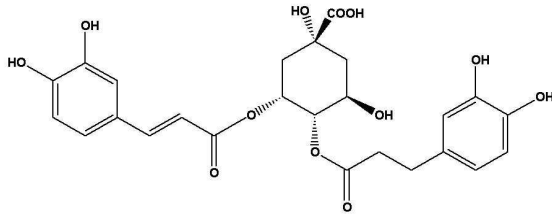
대전 유성구 계룡로 64, 102동 508호 (봉명동, 미
성샤르망)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid)을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 활성을 증가시키는 효과가 있는 것을 특징으로 하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 및 억제학적 부형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 약학 조성물에 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 0.001~99.9 중량%가 포함되는 것을 특징으로 하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 체내의 과다한 지방축적은 비만, 당뇨병, 고지혈증, 지방간, 심혈관질환, 소화기 질환, 다양한 암질환 등을 일으키는 것으로 알려져 있다(Achike, To, Wang, & Kwan, 2011). 이 중, 지방간(steatosis, fatty liver)은 간세포 내에 중성지방이 축적되는 질환으로서, 비알코올성 지방간과 알코올성 지방간으로 크게 그 증상을 나눌 수 있는데, 비만에 따른 지방축적으로 인해 발생할 수 있는 지방간은 주로 비알코올성 지방간에 해당된다.

[0003] 지방간은 간기능 장애의 주요원인으로 일반적 증상이 없이 간경변, 간기능 상실, 간암 등의 복잡하고 점진적 간 손상을 진행시키는 원인이 될 수 있다.

[0004] 지방간은 현재 수많은 사람들이 고통 받고 있는 질환이지만, 다양한 증상을 수반하는 질환 특성상의 복잡성으로 인하여 확실한 진단 및 치료방법을 개발하지 못하고 있는 실정이다.

[0005] 한편, 지방간을 비롯한 대사성 증후군으로 인한 합병증은 식품과 의약계뿐만 아니라 바이오 산업계에서도 지속적인 핫이슈가 되고 있으며, 따라서 국가적으로 이러한 질병발생 패턴의 변화에 맞추어 만성질환에 대한 원

인을 규명하고 이를 예방하거나 치료하는 새로운 기술의 개발이 절실히 필요한 시점이다. 그러나 현재까지는 비알코올성 지방간 질환에 대한 효과적인 약물치료가 없고 다만 식사요법, 운동요법 등을 통한 체중감량 등의 기본적인 치료법만이 권고되고 있기에, 앞으로 비알코올성 지방간에 대한 여러 기전 연구와 지방간의 발생을 억제하는데 필요한 세포 신호전달 체계를 규명함으로써 독창적 작용점에 근거한 비알코올성 지방간 치료제의 개발이 필요하다.

[0006] 한편, 지방간의 원인이 되는 비만은 마른 체형을 좋아하는 젊은이들에게 있어서 미용상의 모습을 해칠 뿐만 아니라 비만이 지속됨으로써 여러 가지 질환, 즉, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 관상동맥질환 등과 같은 성인병을 비롯하여 유방암, 자궁암 및 대장암 등을 야기하는 것으로 보고되면서 이제는 치명적인 질병으로 취급되고 있다. 현재 비만을 치료하는 치료제로는 크게 중추 신경계에 작용하여 식욕에 영향을 주는 약제와 위장관에 작용하여 흡수를 저해하는 약물로 나누어 볼 수 있다. 중추 신경계에 작용하는 약물로는 각각의 기전에 따라 세로토닌(5-HT) 신경계를 저해하는 펜플루라민, 텍스펜플루라민 등의 약물, 노르아드레날린 신경계를 통한 에페드린 및 카페인 등의 약물 및 최근에는 세로토닌 및 노르아드레날린 신경계에 동시 작용하여 비만을 저해하는 시부트라민 등의 약물들이 시판되고 있다. 이외에도, 위/장관에 작용하여 비만을 저해하는 약물로 장관 리파제를 저해하여 지방의 흡수를 줄여 주는 비만 치료제로 허가된 오를리스타트 등이 대표적인 약물로 사용되고 있다. 그러나 기존에 사용되어온 약물 중 펜플루라민 등의 약물은 부작용으로 원발성 폐고혈압이나 심장 판막 병변을 일으켜 최근에 사용이 금지되었으며, 다른 약물들도 혈압감소나 유산산혈증 등의 문제점이 발생하여 심부전, 신질환 등의 환자에는 사용하지 못하는 문제점이 있다.

[0007] AMPK(AMP-activated protein kinase)는 포도당 결핍, 체내 스트레스, 저산소증, 활성산소의 작용 등과 같은 상황에서, LKB1(liver kinase B1)이나 CaMKK β (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase β)로 인해 활성화된다(Fryer, Parbu-Patel, & Carling, 2002; Hurley et al., 2005; Hardie, 2007).

[0008] 체내의 에너지 고갈 상태에서, AMPK는 ACC(acetyl-CoA carboxylase)의 불활성화(ACC의 인산화가 증가됨)를 통해 신생 지방산의 생성(de novo fatty acid synthesis)을 억제하고, CPT-1(carnitine palmitoyltransferase-1), PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor- α), UCP(uncoupling protein) 등의 발현을 증가시켜 지방산 산화를 자극한다.

[0009] AMPK는 이미 당뇨병, 비만, 암 등의 질환에서 포도당과 지방 대사에서 중요한 역할을 하고 있으며(Carling, 2004), 이와 같은 대사성 질환들을 치료하기 위한 주요 타겟이라는 것으로 알려져 있다(Zhang, Zhou & Li, 2009). SREBP(sterol regulatory element binding proteins)는 ACC(acetyl-CoA carboxylase), FAS(fatty acid synthase), HMGCR(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase) 등과 같은 지방관련 효소의 발현을 조절하는 전사인자로서(Goldstein, Rawson, & Brown, 2002), 증가된 SREBP의 발현이 지방간과 강한 관련이 있음을 당뇨병 동물 모델에서 확인된 바 있다(Horton, Goldstein, & Brown, 2002; Yahagi et al., 2002).

[0010] 또한, SREBP-1c의 발현은 포도당, 지방, 콜레스테롤의 대사와 관련된 핵수용체인 LXR- α (liver X receptor- α) 및 LXR- β (liver X receptor- β)에 의해 조절되는데(Calkin & Tontonoz, 2012), 포도당이나 포도당-6-인산이 상기 LXR- α 및 LXR- β 의 직접적인 아고니스트(agonists)인 것으로 보고된 바 있다(Mitro et al., 2007).

[0011] 최근에는 고지방식이 동물 모델(high fat diet induced animal models)에서 AMPK가 SREBP-1을 불활성화하여 지방간 또는 비만을 억제하는 것이 알려진 바 있어, 이와 같이 AMPK와 SREBP가 지방간과 비만의 치료 타겟으로 주로 이용되고 있는 것을 입증하고 있다.

[0012] 함초(*Salicornia herbacea*, 鹹草)는 우리나라 서해안 개펄에 자라는 한해살이 풀로 흔히 염초 또는 통통마디라고도 불리우며, 전체 모양이 산호를 닮았다 하여 산호초라고도 한다. 중국 최고의 의학책인 신농본초경에는 "함초"로, 일본의 대화본초에는 "신초(神草)" 또는 "복초(福草)", "염초(鹽草)"로 기록되어 있으며, 화농성 염증을 치료하고 갖가지 균을 죽이는 작용이 있어 민간요법 치료제로 널리 사용되어 왔다.

[0013] 함초는 몸 안에 쌓인 독소와 숙변을 없애고, 암, 자궁근종, 축농증, 고혈압, 저혈압, 요통, 당뇨병, 기관지천식, 갑상선 기능저하, 갑상선 기능항진, 피부병, 관절염, 신장염이나 갖가지 난치병에 탁월한 치료 효과를 지니고 있는 놀라운 약초라 알려져 있다. 또한 함초는 숙변을 제거하고 비만증을 치료하는 효과가 탁월하며, 혈액순환을 좋게 하고 피를 맑게 하며 혈관을 튼튼하게 하여 염증과 관절염으로 인한 수종 등의 치료에 이용되며, 먹는 화장품이라고 할 만큼 피부미용에 효과가 탁월하다.

[0014] 본 발명자들은 함초 유래의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 항산화효과, 통풍치료, 항염증 효과

등이 있음을 이미 밝힌 바 있으며, 이 후로도 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산에 대해 지속적으로 연구를 하던 중, 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 AMPK의 활성을 증가시키고 SREBP를 억제하여 지방산 생성을 억제하는 효과가 뛰어나 지방간 또는 비만에 뛰어난 치료 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0015] (비특허문헌 0001) Achike, F. I., To, N. H., Wang, H., & Kwan, C. Y. (2011). Obesity, metabolic syndrome, Calkin, A. C., & Tontonoz, P. (2012). Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 213-224.
- (비특허문헌 0002) Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade ?? a unifying system for energy control. *Trends in biochemical sciences*, 29, 18-24.
- (비특허문헌 0003) Fryer, L. G., Parbu-Patel, A., & Carling, D. (2002). The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*, 277, 25226-25232.
- (비특허문헌 0004) Goldstein, J. L., Rawson, R. B., & Brown, M. S. (2002). Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein 383 pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 397, 139-148.
- (비특허문헌 0005) Han, E. H., Park, J. H., Kim, J. Y., Chung, Y. C., & Jeong, H. G. (2009). Inhibitory mechanism of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response in mast cells. *Food and chemical toxicology*, 47, 1069-1075.
- (비특허문헌 0006) Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNR1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, 774-785.
- (비특허문헌 0007) Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation*, 109, 1125-1131.
- (비특허문헌 0008) Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R., & Witters, L. A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *The Journal of biological chemistry*, 280, 29060-29066.
- (비특허문헌 0009) Khanal, T., Choi, J. H., Hwang, Y. P., Chung, Y. C., & Jeong, H.G. (2009). Protective effects of saponins from the root of *Platycodon grandiflorum* against fatty liver in chronic ethanol feeding via the activation of AMP-dependent protein kinase. *Food and chemical toxicology*, 47, 2749-2754.
- (비특허문헌 0010) Noh, J. R., Kim, Y. H., Gang, G. T., Yang, K. J., Kim, S. K., Ryu, S. Y., Kim, Y. S., Lee, C. H., & Lee, H. S. (2010). Preventative effects of *Platycodon grandiflorum* treatment on hepatic steatosis in high fat diet-fed C57BL/6 mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 33, 450-454.
- (비특허문헌 0011) Yahagi, N., Shimano, H., Hast, A. H., Matsuzaka, T., Ide, T., Yoshikawa, T., Amemiya-Kudo, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Ishibashi, S., & Yamada, N. (2002). Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice. *The Journal of biological chemistry*, 277, 19353-19357.
- (비특허문헌 0012) Zang, M. W., Zuccollo, A., Hou, X. Y., Nagata, D., Walsh, K., Herscovitz, H., Brecher, P., Ruderman, N. B., & Cohen, R. A. (2004). AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *The Journal of biological*

chemistry, 279, 47898-47905.

(비특허문헌 0013) Zhang, B. B., Zhou, G., & Li, C. (2009). AMPK: and emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. Cell metabolism, 9, 407-416.

발명의 내용

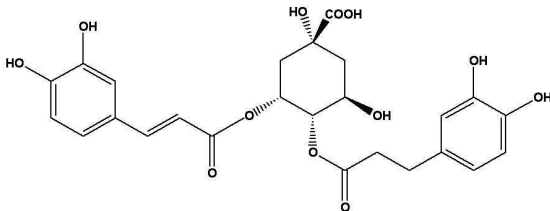
해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료 용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 하기 화학식 1의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ)을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020] 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 활성을 증가시키는 효과가 있으며, FAS(fatty acid synthase) 또는 SREBP(sterol regulatory element binding proteins)의 활성을 억제시키는 효과가 있는 것을 특징으로 한다.

[0021] 또한, 본 발명은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 및 약제학적 부형제를 포함하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물에 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 0.001~99.9 중량%가 포함될 수 있다.

[0022] 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 통상적인 방법으로 합성될 수 있으며, 함초 등의 약용식물로부터 추출될 수 있다. 상기 약용식물의 추출물은 C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 물과의 혼합용매를 이용하여 제조될 수 있으며, 상법에 따라, 유기용매(알코올, 에테르, 아세톤 등)에 의한 추출, 헥산과 물의 분배, 크로마토그래피에 의한 방법 등, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지된 방법을 단독 또는 적합하게 조합한 방법을 이용하여 분획 또는 정제한 후, 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 분리해낼 수 있다.

[0023] 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography), 실리카겔 진공 액체 크로마토그래피(silica gel vacuum liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 중에서 선택될 수 있다.

[0024] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 분리하는 가장 바람직한 방법으로는, 1) 건조된 함초를 메탄올로 추출하고 여과한 후 그 여액을 감압농축하여 메탄올 추출물을 얻는 단계;

[0025] 2) 상기 메탄올 추출물을 증류수에 현탁하고 에틸아세테이트로 진탕 추출하여 물층을 얻는 단계;

[0026] 3) 상기 물층을 흡착 크로마토그래피를 수행하여 메탄올 수용액으로 탈착하여 활성분획을 얻는 단계; 및,

[0027] 4) 상기 활성분획을 감압 건조하여 산성조건에서 아세토나이트릴 수용액으로 로 고속액체크로마토그래피를 수행하여 정제함으로써 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 얻는 단계;를 포함하는 방법을 이용할 수

있다.

[0028] 본 발명에 따른 화합물은 함초로부터 쉽게 분리할 수 있을 뿐만 아니라 안정도도 높으므로 식품, 의약품의 첨가제로 이용할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 및 약제학적 부형제를 포함하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약제학적 부형제는 담체, 부형제 또는 희석제가 사용될 수 있다. 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 함유하는 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. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 생약 혼합물의 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

발명의 효과

[0032] 본 발명은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 함유하는 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 지방간 모델 세포에서 지방산, 콜레스테롤 및 트리글리세리드의 합성을 억제하는 효과가 우수하고, 지방 생성 억제와 관련이 있는 AMPK의 활성을 높이며, 지방산 합성의 전사인자인 SREBP-1 및 FAS의 활성을 억제하는 효과가 뛰어나기에, 지방간 또는 비만의 치료제로서 용이하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 HepG2의 지방간 세포 모델에서 나일 레드 어세이를 통해 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)이 지방축적량을 감소시키는 효과가 있음을 나타내는 그래프이다.

도 2는 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)이 트리글리세리드(Triglyceride)와 총콜레스테롤(Total cholesterol[T-cholesterol])의 함량을 감소시키는 효과가 있음을 나타내는 그래프이다.

도 3A는 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)이 SREBP-1c 및 FAS

의 발현을 감소시키는 효과가 있음을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 3B는 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)이 SREBP-1c 및 FAS의 mRNA 발현을 감소시키는 효과가 있음을 나타내는 리얼타임 PCR 결과이다.

도 3C는 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)이 FAS의 활성을 감소시키는 효과가 있음을 나타내는 루시퍼레이즈 어세이 결과이다.

도 4A는 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)이 AMPK 및 ACC의 인산화를 증가시키는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 4B는 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)의 처리로 인해 감소되어 있던 지방 축적량이 AMPK의 저해제인 컴파운드 C(compound C) 처리시 다시 상승하는 것을 나타낸다.

도 4C는 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)의 처리로 감소되어 있던 트리글리세라이드와 콜레스테롤 함량이 AMPK의 저해제인 컴파운드 C(compound C) 처리시에 다시 상승하는 것을 나타낸다.

도 4D는 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ) 처리로 감소되어 있던 SREBP-1c 및 FAS의 단백질 발현량이 AMPK의 저해제인 컴파운드 C(compound C) 처리시 다시 상승하는 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0035] <실시예 1 : 함초로부터 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 분리>

[0036] 서해안 갯벌에서 채취한 함초 건조물 1.5kg를 쇄절하고 100% 메탄올로 3일 동안 추출하여 감압여과한 후, 그 여액을 60℃의 수조에서 감압농축하여 농축된 메탄올 농축액을 1ℓ의 증류수에 현탁하였다. 증류수에 현탁시킨 메탄올 추출물은 2ℓ의 에틸아세테이트로 진탕 추출하여 물층을 얻은 다음, 상기 물층을 60℃의 수조에서 감압농축하여 물층에 존재하는 에틸아세테이트를 제거하였다. 에틸아세테이트가 제거된 상기 물층을 증류수에 평형화된 다이아이온 에이치피 20 칼럼 크로마토그래피(Diaion HP-20 column chromatography)에 흡착시켜 물로 세척한 후에 메탄올 30% 용액으로 활성물질을 추출하여 활성분획을 얻었다. 이 후, 상기 활성분획을 감압농축하여 소량의 메탄올에 녹여 메탄올에 평형화된 세파덱스 엘에이치 20 칼럼(Sephadex LH-20 gel column chromatography)에서 전개시켜 활성분획을 얻었고, 그 분획을 YMC 젤 ODS 칼럼 크로마토그래피(YSI gel ODS column chromatography)에서 산성조건에서 20% 아세트나이트릴 수용액을 용매로 사용하여 고속액체크로마토그래피를 행하여 분리하였으며, 기기분석 결과 화학식 1과 같은 구조의 화합물, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(3-caffeoyl-4-dihydrocaffeoylquinic acid, CDCQ, molecular formula : $C_{25}H_{26}O_{12}$)을 얻었다 (Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from Salicornia herbacea, Arch. Pharm. Res. 28, 2005, 1122-1126).

[0037] 한편, 상기 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 물리 화학적 성질은 하기 표 1과 같다.

표 1

		δ_H	δ_C
Quinic acid moiety	1	-	75.1
	2	2.08 1H, m 2.30 1H, dd (<i>J</i> 15, 3.9 Hz)	36.9
	3	5.57 1H, q (<i>J</i> 3.9 Hz)	69.9
	4	4.88 1H, m	76.6
	5	4.28 1H dt (<i>J</i> 9.3, 3.9 Hz)	65.7
	6	2.06 1H, m 2.17 1H, m	41.9
	7 (carboxyl)	-	177.8
Caffeoyl moiety	1'	-	127.0
	2'	7.04 1H, d (<i>J</i> 2.1 Hz)	115.1
	3'	-	149.5
	4'	-	146.7
	5'	6.77 1H, d (<i>J</i> 8.1 Hz)	116.5
	6'	6.94 1H, dd (<i>J</i> 8.1, 2.1 Hz)	123.0
	7'	6.26 1H, d (<i>J</i> 15.9 Hz)	115.2
	8'	7.50 1H, d (<i>J</i> 15.9 Hz)	147.3
	9'	-	168.6
Dihydrocaffeoyl moiety	1''	-	133.5
	2''	6.65 1H, d (<i>J</i> 2.1 Hz)	116.3
	3''	-	146.1
	4''	-	144.5
	5''	6.64 1H, d (<i>J</i> 8.1 Hz)	116.3
	6''	6.48 1H, d (<i>J</i> 8.1, 2.1 Hz)	120.4
	7''	2.75 2H, m	31.2
	8''	2.55 2H, m	37.2
	9''	-	174.0

[0038]

[0039] <실시예 2. 세포 배양, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산의 처리 및 지방간 세포 유도>

[0040] HepG2 세포는 5mM 글루코스, 10% FBS(fetal bovine serum), 100U/ml 페니실린, 100mg/ml 스트렙토마이신, 2mM L-글루타민 DMEM(Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) 배지를 이용하여, 37℃의 5% CO₂ 상태에서 유지되었다.

[0041] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 처리하기 전에, 세포배양접시에서 HepG2 세포가 70% 이상 자라게 되면, FBS가 없는 세포배양액에서 HepG2 세포를 18시간 동안 배양한 후, DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0~1μg/ml의 농도로 각 실험조건에 맞게 시간별로 처리하였다. 이 때 DMSO의 농도는 세포배양액의 0.1%(v/v)가 되지 않도록 하였다.

[0042] 글루코스 고함량 축적 상태인 지방간 세포 모델(cell model of high-glucose-induced accumulation of hepatic lipids)은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 처리 이후에, HepG2 세포에 고농도의 글루코스(30mM)를 24시간 동안 처리하여 유도하였다(Zang et al., 2004).

[0043] <실시예 3. 지방 축적량 확인>

[0044] 지방 축적량은 나일 레드 염색 어세이(Nile Red staining assay)를 이용하여 확인하였다. HepG2 세포에 24시간 동안 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0~1μg/ml 농도로 처리한 후, 고농도의 글루코스(30mM)를 24시간 동안 추가 처리하여 지방간 세포 모델을 유도하였으며, 대조군 세포는 일반 배지에서 배양하였다. 이후, 상기 세포를 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)로 세척하였으며, 염색이 수행되기 전의 형광도를 형광분석기(Varioskan; Thermo Electron Co.)를 이용하여 535nm(emission) 및 580nm(excitation)에서 미리 확인하였다. 세포에 나일 레드를 처리하기 위해, 1mM 상태의 나일 레드(Nile red, 1mM stock solution in DMSO with 1% Pluronic F127[Sigma])를 HBSS에 1mM로 희석하여, 각 세포 배양 웰(well)에 100μl씩 처리하여 1시간

동안 실온의 암실에서 반응시켰다.

[0045] 이 후, 나일 레드를 제거하고 세포를 HBSS로 세척한 후, HBSS가 처리된 상태로 세포를 1시간 동안 실온의 암실에서 다시 반응시켰고, 이 후 형광도를 측정하여, 나일 레드 처리전의 값과 비교하여 각각의 샘플이 처리된 HepG2 세포에 대한나일레드의 순수한 형광도 값을 확인하였으며 이에 대한 결과는 도 1에 나타내었다.

[0046] 도 1을 참고하면 HepG2 지방간 세포 모델에서 증가되어 있던 지방축적량이 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)의 처리로 인해 감소되는 효과가 있는 것으로 확인된다.

[0047] <실시에 4. 총콜레스테롤과 트리글리세리드의 함량 확인>

[0048] HepG2 세포에 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0~1 μ g/ml 농도로 24시간 동안 처리하고, 다시 고농도의 글루코스(30mM)를 24시간 동안 처리하여 지방간 세포 모델을 유도하였으며, 대조군 세포는 일반 배지에서 배양하였다. 이 후 Zang et al., 2004에 개시된 방법으로 세포 내 트리글리세리드와 총콜레스테롤의 함량을 확인하였다.

[0049] 이를 위해, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 처리된 HepG2 세포들을 수집한 후, 상기 HepG2 세포 100mg을 1ml의 PBS에서 균질화하고, 5ml의 클로로포름:메탄올(2:1, v/v)과 혼합하여 불텍싱하였다. 각 샘플이 2개의 층으로 분리되면, 이를 2,000rpm, 10분, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 원심분리하였다. 원심분리된 유기용매층(상층)을 질소가소로 기화시켜 건조하였다. 이 후, 상기 건조된 샘플에서 트리글리세리드 및 콜레스테롤 함량 측정 키트(Asan Pharm Co., Seoul, Korea, 트리글리세리드: #AM157S-K; 콜레스테롤: #AM202-K)를 이용하여 총콜레스테롤과 트리글리세리드의 함량을 확인하였으며 이에 대한 결과는 도 2에 나타내었다.

[0050] 도 2를 참고하면 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)의 농도 의존적으로 트리글리세리드(Triglyceride)와 총콜레스테롤(Total cholesterol[T-cholesterol])의 함량이 감소되는 효과가 있는 것으로 확인된다.

[0051] <실시에 5. FAS 및 SREBP-1c 활성 확인>

[0052] 실시예 5-1. 단백질 발현을 통한 FAS 및 SREBP-1c 발현 확인

[0053] HepG2 세포에 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0~1 μ g/ml 농도로 24시간 동안 처리하고, 다시 고농도의 글루코스(30mM)를 24시간 동안 처리하여 지방간 세포 모델을 유도하였으며, 대조군 세포는 일반 배지에서 배양하였다.

[0054] 이 후, 상기 세포들을 모아서 PBS로 세척한 후, 100 μ l의 세포용해버퍼(120mM NaCl, 40 mM Tris, pH 8, 0.1% NP40)에 녹인 후(4 $^{\circ}$ C, 30분), 용해된 액상을 13,000 $\times$ g에서 15분간 원심분리하고, 상등액만을 모아서 BCA 단백질 어세이를 이용하여 단백질 정량을 하였다.

[0055] 정량된 결과를 참고하여 80 μ g씩의 단백질을 10% SDS-PAGE(10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 분리한 후, PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 이 후, FAS, SREBP-1c, β -actin의 1차 항체 및 이들에 대한 2차 항체와 반응시켜 각 단백질의 양을 확인하였으며, 이에 대한 결과는 도 3A에 나타내었다.

[0056] 도 3A를 참고하면, HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)이 SREBP-1c 및 FAS의 발현을 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있다(fold값 대비 대략 최대 1/2배로 감소).

[0057] 실시예 5-2. mRNA 발현을 통한 FAS 및 SREBP-1c 발현 확인

[0058] HepG2 세포에 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0~1 μ g/ml 농도로 24시간 동안 처리하고, 다시 고농도의 글루코스(30mM)를 24시간 동안 처리하여 지방간 세포 모델을 유도하였으며, 대조군 세포는 일반 배지에서 배양하였다.

[0059] 이 후 총 RNA는 다카라 코리아 바이오메디칼사의 RNAiso Plus(TaKaRa Korea Co., Seoul, Korea) 제품으로 분리하여 cDNA를 제작하였다. FAS 및 SREBP-1c의 mRNA 분석을 qRT-PCR(Quantitative real-time RT-PCR)로 확인하였으며, SYBR^{??} 227 Green과 Sequence Detection System software version 1.7(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 분석하였으며 이에 대한 결과는 3B에 나타내었다.

[0060] qRT-PCR에 사용된 프라이머(primers, [5'→3'])의 염기서열은 하기와 같다.

- [0061] SREBP-1c forward, GCC ATG GAT TGC ACT TT;
- [0062] SREBP-1c reverse, CAA GAG AGG AGC TCA ATG;
- [0063] FAS forward, GAA ACT GCA GGA GCT GTC;
- [0064] FAS reverse, CAC GGA GTT GAG GCG CAT;
- [0065] β -actin forward, TGG CAC CCA GCA CAA TGA A;
- [0066] β -actin reverse, CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A;
- [0067] 한편, mRNA의 변화량(DNA증폭량)은 β -actin을 기준으로 평균화하여 비교하였다.
- [0068] 도 3B를 참고하면, HepG2의 지방간 세포 모델에서 SREBP-1c와 FAS의 mRNA의 발현량이 크게 증가되어 있었으나, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)의 처리로 인해 SREBP-1c와 FAS의 mRNA의 발현량이 감소되는 효과가 있는 것으로 확인된다.
- [0069] **실시예 5-3. 루시페레이즈 어세이를 이용한 SREBP-1c 활성 확인**
- [0070] SREBP-1c의 활성 확인을 위해 트랜스펙션 및 리포터 유전자 어세이(Promega, #E4530)를 수행하였다. 이를 위한 wild-type SREBP-1c의 프로모터(pSREBP(-1516/+40)-luciferase)를 포함하는 루시페레이즈 리포터는 Dr. Cagen (University of Tennessee, TN)으로부터 제공받았다. 트랜스펙션은 LipofectAMINE 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 트랜스펙션을 위해 HepG2 세포에 루시페레이즈 리포터 유전자(luciferase reporter gene)가 결합된 0.5 μ g의 wild-type SREBP-1c 프로모터, 및, 레닐라 루시페레이즈 리포터 207 유전자(renilla luciferase reporter 207 gene)를 포함하는 25ng의 대조군 플라스미드 phRL-TK가 세포에 동시에 트랜스펙션 되었다.
- [0071] 이 후 상기 트랜스펙션된 세포를 이용하여 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 0~1 μ g/ml 농도로 24시간 동안 처리하였으며, 다시 고농도의 글루코스(30mM)를 24시간 동안 처리하여 지방간 세포 모델을 유도하였고(실시예 2와 동일한 방법), 대조군 세포는 일반 배지에서 배양하였다. SREBP-1c의 프로모터의 활성은 레닐라 루시페레이즈의 활성을 이용하여 확인(Promega, #E4530)하였고, 그 결과는 도 3C에 나타내었다.
- [0072] 도 3C를 참고하면 HepG2의 지방간 세포 모델에서 지방산 합성의 전사인자인 SREBP-1c의 활성이 크게 증가되어 있었으나, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)을 처리하여 SREBP-1c의 활성이 감소되는 것으로 확인된다.
- [0073] **<실시예 7. 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산으로 유도되는 AMPK 활성 확인>**
- [0074] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산으로 유도되는 AMPK 활성 확인을 확인하기 위해, HepG2의 지방간 세포 모델에 AMPK의 저해제인 컴파운드 C(Compound C)를 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산과 동시에 처리하였다. 상기 컴파운드 C 외에 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 처리한 조건은 실시예 6과 동일하다.
- [0075] **실시예 7-1. AMPK 및 ACC의 인산화 확인**
- [0076] 실시예 5-1에 개시된 방법과 동일하게 웨스턴 블롯을 수행하여 AMPK 및 ACC의 인산화 확인하였으며 이에 대한 결과는 도 4A에 나타내었다.
- [0077] 도 4A를 참고하면, HepG2의 지방간 세포 모델에서 감소되어 있던 AMPK와 ACC의 인산화가 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)을 처리함으로써 인해 증가되는 것으로 확인된다(fold값 대비 대략 최대 5~9배 증가).
- [0078] **실시예 7-2. 지방 축적량 확인**
- [0079] 실시예 3에 개시된 방법과 동일하게 지방 축적량을 확인하여 이에 대한 결과는 도 4B에 나타내었다.
- [0080] 도 4B를 참고하면, HepG2의 지방간 세포 모델에서 감소되어 있던 지방 축적량이 컴파운드 C(compound C)의 처리로 인해 다시 상승되는 것을 확인함으로써 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)이 AMPK의 활성화와 관련이 있음을 알 수 있다.
- [0081] **실시예 7-3. 콜레스테롤과 트리글리세리드의 함량 확인**

- [0082] 실시예 4에 개시된 콜레스테롤과 트리글리세리드의 함량 확인 방법을 이용하여 이에 대한 결과는 도 4C에 나타내었다.
- [0083] 한편, 도 4C를 참고하면, 이러한 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)의 처리로 인해 줄어들어 있던 콜레스테롤과 트리글리세리드의 함량이 AMPK의 저해제인 컴파운드 C(compound C)를 처리하였을 때, 다시 상승되는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 실시예 7-2에서와 마찬가지로, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 AMPK의 활성화와 관련이 있음을 입증할 수 있다.
- [0084] **실시예 7-4. FAS 및 SREBP-1c의 단백질 발현량 확인**
- [0085] 실시예 5-1에 개시된 방법과 동일하게 웨스턴 블롯을 수행하여 FAS 및 SREBP-1c의 단백질 발현량을 확인하여 이에 대한 결과를 도 4D에 나타내었다.
- [0086] 도 4D를 참고하면 HepG2의 지방간 세포 모델에서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)의 처리로 인해 감소되어 있던 SREBP-1c 및 FAS의 발현량이 AMPK의 저해제인 컴파운드 C(compound C)를 처리하였을 때, 다시 증가되는 것을 확인함으로써 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 AMPK의 활성화와 관련이 있음을 확인할 수 있다.
- [0087] **<실시예 8. DIO(Diet-Induced Obesity) 모델에서 항비만 효과 검증>**
- [0088] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산은 100mg/kg의 농도로 매일 경구투여 하였으며 경구투여 전에 메틸 셀룰로오스(Sigmaco.USA) 5% 수용액에 녹여서 준비하였다.
- [0089] 본 실험을 진행하기 위하여 7주령의 C57BL/6J 수컷 생쥐를 대상으로 군당 10마리씩 준비하였으며, 1주간의 적응기간을 가진 후, 개별 우리에 분리하여 12시간 간격의 낮(오전 7시~오후5시)과 밤의 주기에 따라 관리하였다. 실험군은 1)고지방식이군, 2)고지방식이+3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ) 100mg/kg/day 섭취군의 총 2개 군으로 나뉘어 1일 1회씩 8주 동안 일정한 시간(오전 10시)에 경구로 투여하였다. 체중은 매주 1회(오전 11시) 측정을 실시하였으며, 투여시작 8주 후에 실험군과 대조군의 최종 체중을 측정하여 분석하였으며, 표 2에 체중 변화량을 기재하였다.

표 2

그 룹	경구투여 후 체중변화량 (g)						
	14일	21일	28일	35일	42일	49일	56일
고지방식이	4.62 ±0.63	6.72 ±0.49	8.94 ±0.58	10.63 ±0.36	11.59 ±0.52	12.79 ±0.63	13.96 ±0.53
CDCQ + 고지방식이	3.41 ±0.22	4.07 ±0.64	4.90 ±0.47	7.01 ±0.25	8.26 ±0.41	8.97 ±0.69	9.33 ±0.75

- [0090]
- [0091] 표 2를 참고하면, 고지방식이만 섭취하였던 군에 비해서 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산(CDCQ)을 함께 섭취한 군의 체중증가가 현저하게 낮음을 확인할 수 있어, 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산이 비만 억제 및 다이어트 효과가 있는 것을 알 수 있다.
- [0092] **<실시예 9. 독성실험>**
- [0093] **실시예 9-1. 급성독성**
- [0094] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물 체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 20마리를 대조군과 실험군에 각각 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v) 만을 투여하고, 실험군은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 2g/kg/day 농도로 상기 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v)에 녹여 각각 경구투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 라티코딘 D를 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.
- [0095] **실시예 9-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험**

[0096] 장기 독성 실험은 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 각 농도(최고 농도 2g/kg/day)로 8주 동안 C57BL/6J 마우스(각 군당 10마리)에 투여하여 실험하였다. 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산을 투여한 실험군과 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v)만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 모든 조직에서 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0097] <제제에 1 : 약학적 제제>

[0098] 1-1. 정제의 제조

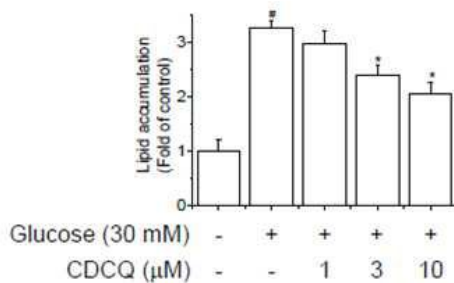
[0099] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0100] 1-2. 주사액제의 제조

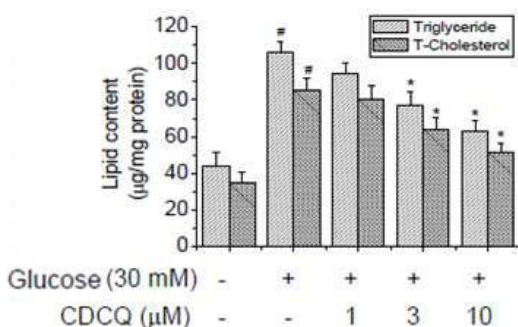
[0101] 3-카페오일-4-다이하이드로카페오일 퀴닉산 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

도면

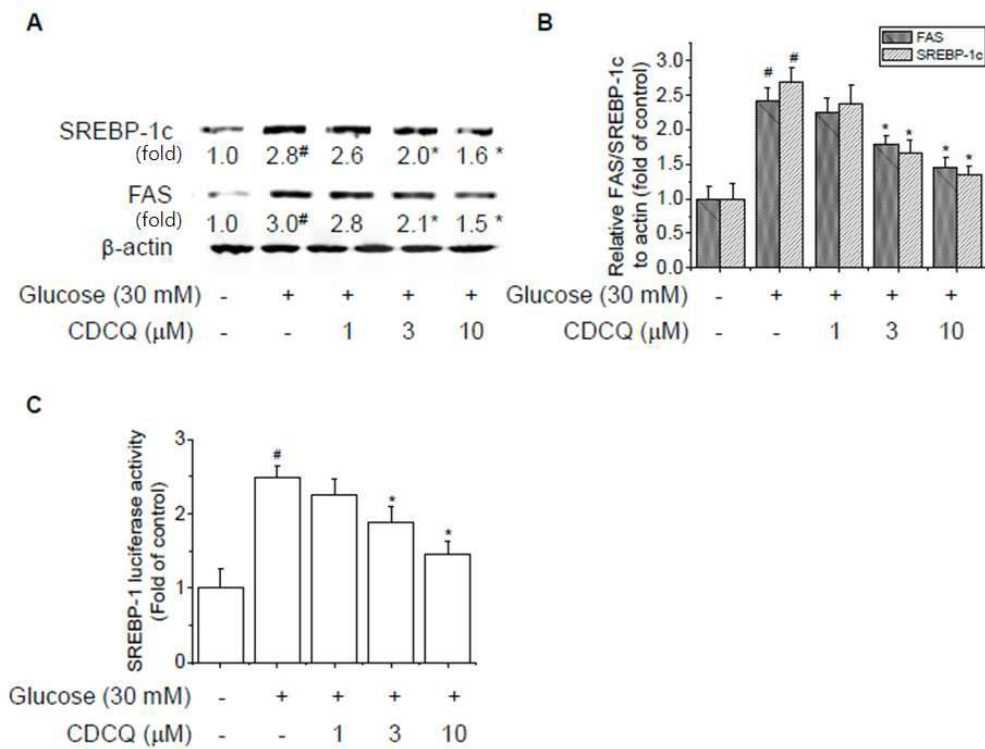
도면1



도면2



도면3



도면4

