



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0123697
(43) 공개일자 2014년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0040833
(22) 출원일자 2013년04월15일
심사청구일자 2013년04월15일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
서준교
강원도 춘천시 충열로 29, 107-303 (우두동, 롯데
인벤스아파트)
남하진
강원도 춘천시 보안길 40, 318-201(주공3
차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

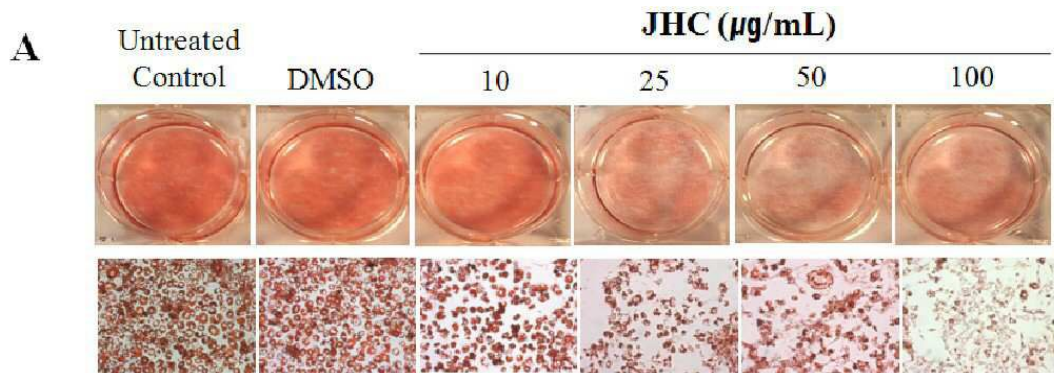
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **칠엽수 수피 추출물을 함유하는 항비만 조성물**

(57) 요약

칠엽수 줄기 수피 에탄올 추출물의 지방축적 억제효과를 시험하였다. 칠엽수 추출물 (10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 세포를 72 시간 동안 노출시킨 것은 미처리 대조군과 비교하여 세포 생존율에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 칠엽수 추출물은 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 투여량 의존적으로 3T3-L1 지방세포의 지방 축적을 저해하였다. 지방세포생성의 주요 마커들인 PPAR γ 및 C/EBP α 발현은 미처리 대조군과 비교할때 8일간 세포에 칠엽수 추출물을 처리한 경우 현저히 감소하였다 ($p<0.01$). 이러한 결과는 칠엽수 추출물이 천연 항비만 물질로서 치료제로 이용될 수 있음을 제시해 주는 것이다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

정혜리

강원도 춘천시 교운가길 14, 130-4(교동)

김진규

강원도 춘천시 승지골길16번길 47, 1005-1103(퇴계동, 퇴계뜨란채아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A6A1048184

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 중추신경계 질환치료를 위한 천연물 유래 신소재 개발 및 기전연구(항당뇨/항비만 효능평가
가팀 : 천연추출물 유래 지질강화 효과 및 항당뇨 유효물질 검색 및 기전규명)

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

철엽수 수피 추출물을 포함하는 항비만 약학 조성물

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 철엽수 수피 추출물은 열수, 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 항비만 약학 조성물

청구항 3

철엽수 수피 추출물을 포함하는 항비만 식품

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 식품은 음료 형태인 것을 특징으로 하는 항비만 식품

청구항 5

청구항 3에 있어서,

상기 철엽수 수피 추출물은 열수, 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 항비만 식품

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 철엽수 수피 추출물을 함유하는 항비만 조성물에 관한 것으로서, 철엽수 추출물은 투여량 의존적으로 지방세포의 지방 축적을 저해하였고, 8일간 세포에 철엽수 추출물을 처리한 경우 지방세포생성의 주요 마커들인 PPAR γ 및 C/EBP α 발현이 미처리 대조군과 비교할 때 현저히 감소하였다.

배경기술

[0002] 비만은 전세계적으로 만연하고 있고 점점 증가하는 심각한 공중보건 문제가 되어가고 있다. 비만은 과다 칼로리 섭취가 지방조직 내에 트리글리세라이드로 축적되고 에너지 소모가 감소함으로써 발생한다. 비만은 인슐린 저항성 타입 2 당뇨병, 심혈관계 질환, 고혈압, 고지혈증, 비알콜성지방간, 뇌졸중 및 종양 발생 위험을 증가시킨다.

[0003] 과거에는 비만 치료에 몇 개의 약물이 이용되었다. 그렇지만 심각한 부작용으로 인하여 최근에는 많은 항비만제가 시장에서 철수한 상태이다. 현재는 orlistat만이 장기간 사용 가능한 항비만제로서 허가받은 상태이지만, 비만 인구가 점점 증가하는 추세이기 때문에 부작용이 없는 새로운 항비만제의 출현이 요구되고 있다.

[0004] 지방조직은 인체 에너지 항상성 유지에 필수적인 역할을 수행한다. 비만은 대부분 에너지 불균형에서 발생하며 지방조직 과성장에 의한 것이다. 따라서, 비만 치료에서 지방세포는 가장 중요한 타겟 중 하나이다. 지방조직 확장은 지방세포 크기가 커지는 것 및 지방세포 수가 증가하는 것에 기인한다. PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ) 및 C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein- α)는 지방세포생성에서 주요 전사인자로 보고된바 있다 (Park D.Y. et al., J. Med. Food. 14: 670-675 (2011)). 지방조직의 양은 이들 주요 전사인자의 조절을 통하여 지방세포생성을 저해함으로써 감소시킬 수 있다.

[0005] 칠엽수 (Japanese horse chestnut, *Aesculus turbinata*)는 활엽수이고, 주로 한국과 일본에 분포한다. 칠엽수 종자와 잎은 일본에서 식품으로 이용되어 왔다. 칠엽수 종자는 항비만 활성, 항산화활성 및 항유전독성 활성을 비롯한 생물학적 활성을 나타내는 것으로 보고된바 있다. 그러나, 칠엽수 수피에 관한 연구는 거의 없었다.

[0006] Kimura H. et al. (J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 4783-4788)은 칠엽수 식용 종자로부터 얻은 새로운 사포닌의 항비만 효과를 개시하였다. 그러나, 칠엽수 종자와 수피는 그 구성물질이 다르고 효과 또한 달라 칠엽수 종자의 항비만 효과로부터 칠엽수 수피의 동일한 효과를 기대하기는 결코 용이하지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 부작용 없이 지방세포생성을 억제하는 항비만 조성물의 제공을 목적으로 한다. 상기 항비만 조성물은 약학 조성물 또는 식품을 나타낸다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은 수십 종의 천연물에 대하여 항-지방세포생성 활성을 스크린하여 그 중 활성이 높은 천연물들을 선택하고, 그 중에서도 세포독성이 없고 항비만 효과가 높은 칠엽수 수피 추출물을 선택하여 항비만 약학 조성물 및 식품으로의 응용 가능성을 시험한 것이다.

[0009] 지방세포 분화에 대한 칠엽수 수피 추출물의 항-지방세포생성 효과

[0010] 수십 종의 천연물에 대한 항-지방세포생성 활성 스크린을 위한 인비트로 분석 시스템으로서 3T3-L1 지방전구세포를 이용하였고, 칠엽수 수피 추출물이 현저한 저해활성을 나타내었다 (도 1). 지방세포생성에 대한 칠엽수 수피 추출물의 저해효과는 오일 레드 O 염색으로 관찰되었다. 형태학적 관찰에서 보이는 바와 같이, 칠엽수 수피 추출물 처리 세포에서 지방 축적은 미처리 대조군 세포와 비교할 때 매우 낮았다 (도 1A). 칠엽수 수피 추출물 처리 세포는 미처리 대조군 세포와 비교할 때 지방축적이 현저히 감소하였다 (도 1B). 결과들은 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 칠엽수 수피 추출물이 각각 미처리 대조군 세포의 40, 42 및 46%까지 지방 축적을 저해함을 보여 주었다. 그렇지만, 분화된 지방세포를 사용한 실험에서는 칠엽수 수피 추출물의 저해효과가 거의 나타나지 않았다 (데이터 나타내지 않음). 이러한 결과들은 칠엽수 수피 추출물이 항-지방세포생성 효과가 있음을 제시한다.

[0011] 세포 생존율에 대한 칠엽수 수피 추출물의 효과

[0012] 지방세포 분화의 초기단계에 있는 3T3-L1 세포 생존율에 대한 칠엽수 수피 추출물의 효과를 조사하기 위해 분화 중인 3T3-L1 세포를 다양한 농도 (0, 10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$)의 칠엽수 수피 추출물로 72시간 동안 처리하였다. 도 2와 같이, 칠엽수 수피 추출물로 처리한 세포들은 대조군 세포와 비교하여 세포 생존율에 아무런 영향이 없었다.

[0013] PPAR γ 및 C/EBP α 발현에 대한 칠엽수 수피 추출물의 효과

[0014] PPAR γ 및 C/EBP α 는 지방세포 분화중 주요한 전사인자들이다 (Park D.Y. et al., J. Med. Food. 14: 670-675

(2011)). 본 발명자들은 칠엽수 수피 추출물이 항-지방세포생성 효과를 나타내는 분자적 메커니즘을 조사하기 위해 지방세포생성에 관련된 주요 전사마커를 분석하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 8일간 칠엽수 수피 추출물에 노출시킨 후 본 발명자들은 PPAR γ 및 C/EBP α 단백질 수준을 측정하였다. 미처리 대조군 세포와 비교하여 칠엽수 수피 추출물을 처리한 세포는 이들 단백질 발현이 현저히 억제되었다 (도 3). 결론적으로 칠엽수 수피 추출물은 PPAR γ 및 C/EBP α 를 저하조절함으로써 세포 생존율에 영향을 미치지 않고 지방세포생성을 현저히 저해하였다. 따라서, 칠엽수 수피 추출물은 비만 예방 및/또는 치료용 약제로 이용할 수 있다.

[0015] 본 발명은 칠엽수 수피 추출물을 포함하는 항비만 약학 조성물에 관한 것이다.

[0016] 본 발명은 상기 칠엽수 수피 추출물이 열수, 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명은 칠엽수 수피 추출물을 포함하는 항비만 식품에 관한 것이다.

[0018] 상기 식품은 음료 형태, 건강기능성 식품, 빵, 과자 등 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 칠엽수 수피 추출물이 열수, 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 항비만 식품에 관한 것이다.

[0020] 칠엽수 수피 추출물을 얻는 방법의 일 실시예는 다음과 같다.

[0021] 칠엽수 수피를 음건하여 세절한 칠엽수 수피 부피의 2배 내지 200배, 바람직하게는 10배 내지 30배의 유기용매를 가하고, 10℃ 내지 30℃에서 1일 내지 20일간, 바람직하게는 5일 내지 10일간 추출하고 여과한 후 감압농축함으로써 칠엽수 수피 추출물을 제조할 수 있다. 이때, 추출용매로는 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올, 아세톤, 아세톤 수용액, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매를 사용할 수 있다. 또는 70~100℃ 열수추출도 가능하다.

[0022] 상기 칠엽수 수피 추출물 제조시 유기용매로 추출하여 얻은 칠엽수 수피 추출물에 헥산, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 중에서 선택된 어느 하나 이상의 용매로 재추출하는 단계를 1회 이상 추가로 더 포함하여 칠엽수 수피 추출물을 제조할 수 있다.

[0023] 본 발명의 칠엽수 수피 추출물을 포함하는 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 상기한 기능을 갖는 약학 조성물을 제조할 수 있다. 상기에서 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물 유를 들 수 있다.

[0024] 상기 칠엽수 수피 추출물을 포함하는 약학 조성물은 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 상기에서 제형은 정제, 알약, 분말, 새세이(sachet), 엘릭서(elixir), 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 유효성분을 기준으로 할 때 칠엽수 수피 추출물은 10mg/kg 체중 내지 100mg/kg 체중, 바람직하게는 10mg/kg 체중 내지 30mg/kg 체중의 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 활성성분의 실제 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0027] 본 발명은 칠엽수 수피 추출물을 포함하는 항비만 식품을 포함한다.
- [0028] 본 발명은 칠엽수 수피 추출물을 포함하여 비만 및 비만 합병증을 예방하거나 완화시킬 수 있는 건강 증진용 식품 또는 음료 조성물을 제공할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 칠엽수 수피 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들면 각종 식품류, 음료수, 과자류, 껌, 아이스크림, 차, 인스턴트차, 과일, 향료, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 칠엽수 수피 추출물을 식품 제조시 원료 물질에 첨가하거나 조리된 식품에 적절히 혼합하여 상기한 건강 증진용 식품 또는 음료를 제조할 수 있으며, 이 경우 최종적으로 제조된 식품 또는 음료 중에 칠엽수 수피 추출물의 함량은 0.01중량% 내지 30중량% 범위일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학 조성물, 또는 건강 증진용 식품 또는 음료는 목적하는 효과를 상승시키거나 보완하기 위해 약학적으로 허용되는 다른 생약제 또는 이의 추출물을 추가로 포함할 수 있으며, 그러한 생약제의 대표적인 예로는 우슬, 당귀, 황백 및 울금 등을 들 수 있다. 상기 생약제는 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01중량% 내지 50중량%의 양으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명의 칠엽수 수피 추출물을 포함하는 조성물은 지방세포 분화억제, 지방축적 억제 및 지방세포 생성억제 효과가 우수하므로, 비만의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 지방세포 분화에서 지방축적에 대한 칠엽수 수피 추출물의 효과를 나타낸다. 3T3-L1 지방전구세포 (preadipocytes)는 전체 분화과정 동안 (0-8일) 시료로 처리하였다. 지방세포의 대표적인 현미경 형태학적 이미지는 0, 10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 칠엽수 수피 추출물로 처리한 다음 8일 후 오일 레드 O로 염색하고, 현미경 사진은 200배로 촬영하였다 (A). 오일 레드 O 염색한 세포의 아이소프로판올 용출로부터 측정된 흡광도는 (B)에 나타내었다. 값은 세 번의 독립적 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 표현하였다. $**P < 0.01$, $***P < 0.005$ 는 미처리 대조군과 비교한 값이다. "JHC"는 칠엽수 수피 추출물을 의미한다.
- 도 2는 분화한 지방세포의 생존율에 대한 칠엽수 수피 추출물의 효과를 나타낸다. 3T3-L1 세포를 충분히 배양한 다음 지방형성 촉진 콕테일 (adipogenic cocktail)과 다양한 농도의 칠엽수 수피 추출물 (0, 10, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 함께 72시간 동안 배양하였다. 세포 생존율을 시험하는 CCK-8 분석을 처리 72시간 후 수행하였다. 값은 세 번의 독립적인 실험에 대한 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. $**P < 0.01$, $***P < 0.005$ 는 미처리 대조군과 비교한 것이다. "JHC"는 칠엽수 수피 추출물을 의미한다.
- 도 3은 웨스턴 블랏 분석으로 지방세포 형성과 관련된 단백질 발현에 대한 칠엽수 수피 추출물의 영향을 나타낸 것이다. 결과는 분화 8일째에 칠엽수 수피 추출물로 처리한 3T3-L1 세포에서 PPAR γ (A) 및 C/EBP α (B) 발현 수준이 감소하였음을 보여준다. 이 신호들은 β -액틴으로 표준화하였다. 값은 세 번의 독립 실험에 대하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. $**P < 0.01$, $***P < 0.005$ 는 미처리 대조군과 비교한 것이다. "JHC"는 칠엽수 수피 추출물을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0035] 시약 및 시료

- [0036] 3T3-L1 지방전구세포는 ATCC (American Type Culture Collection) (Manassas, VA, USA)에서 입수하였다. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), β -액틴 항체, 인슐린, IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), 오일 레드 O 용액 및 텍사메타손은 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 우태혈청, NCS (newborn calf serum), 25% 트립신-EDTA 및 항생제, 항미생물제는 Gibco (Rockville, MD, USA)에서

구입하였다. 세포계수 키트-8 (CCK-8)은 Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Kumamoto, Japan)에서 구입하였다. Quant-iT 단백질 분석키트는 Invitrogen (Auckland, New Zealand)에서 구입하였고, PPAR 및 C/EBP에 대한 항체들은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 입수하였다. 호스 래디쉬 퍼옥시다이스-결합된 염소 항-토끼 IgG는 Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)에서 구입하였다.

[0037] 칠엽수 추출물 제조

[0038] 칠엽수 (*Aesculus turbinata*) 줄기 수피는 강원도 산림개발연구원에서 제공받았다. 보증용 건본 (G-11-09)은 강원도 산림개발연구원 식물표본실에 기탁하였다. 칠엽수 줄기 수피는 분말화하고 상온에서 3일간 70% 에탄올 2×10 ℓ로 두 번 추출하였다.

[0039] 세포 배양

[0040] 3T3-L1 지방전구세포는 10% NCS, 100 IU/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 5% CO₂를 함유한 습한 조건에서 37 °C로 세포가 충분히 자랄 때까지 유지, 배양하였다. 지방세포형성을 유도하기 위해 세포는 충분히 자란 다음 이를 후까지 배양하였고, 그런 다음 10% FBS 함유 DMEM에 5 µg/ml 인슐린, 0.5 µM 텍사메타손 및 0.5 µM IBMX를 포함하는 분화 촉진 혼합물을 가하여 유도하였다. 그런 다음 5 µg/ml 인슐린 함유 10% FBS/DMEM으로 이들에 한 번 배지를 바꾸었다. 시료는 분화 개시 시점에서 칠엽수 수피 추출물을 각각 0, 10, 25, 50 및 100 µg/ml로 처리하였고, 각 배지는 8일마다 바꾸었다.

[0041] 오일 레드 O 염색

[0042] 오일 레드 O 염색은 다음과 같이 수행하였다. 분화된 지방세포를 PBS로 세척한 다음 10% 포르말린이 함유된 PBS로 실온에서 60분간 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 세 번 세척한 다음 실온에서 30분간 여과된 오일 레드 O 용액으로 염색한 후 세포를 증류수로 두 번 세척하였다. 세포 형태는 도립현미경 (inverted microscope)(ZEISS, Oberkochen, Germany)으로 시험하였고, 이미지는 디지털 카메라 (Nikon, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 염색된 오일 방울은 아이소프로판올로 용해시킨 다음 형광 마이크로플레이트 판독기 (Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 정량하였다. 값은 미처리 대조군과 비교하여 백분율로 계산하였고, 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

[0043] 세포 생존율 분석

[0044] 세포 생존율은 CCK-8을 이용하여 결정하였다. 간단히 설명하면, 각각 0, 10, 25, 50 및 100 µg/ml 칠엽수 수피 추출물이 없는 상태 또는 있는 상태에서 지방세포형성 촉진 각테일로 3T3-L1 세포를 자극하였고, 이 실험은 96 웰 플레이트 (각 웰당 5,000개의 세포)에서 72시간 동안 수행하였다. 각기 지시된 시간 이후 시험물질을 넣은 DMEM은 20 µl의 CCK-8 용액과 DMEM으로 교체하여 어두운 곳에서 두 시간 동안 배양하였다. 생존 세포 내의 탈수소효소 활성의 양은 형광 마이크로플레이트 판독기 (Spectramax/M2^e, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm의 흡광도를 측정하여 탐지하였다. 각 분석은 세 번씩 수행하였다.

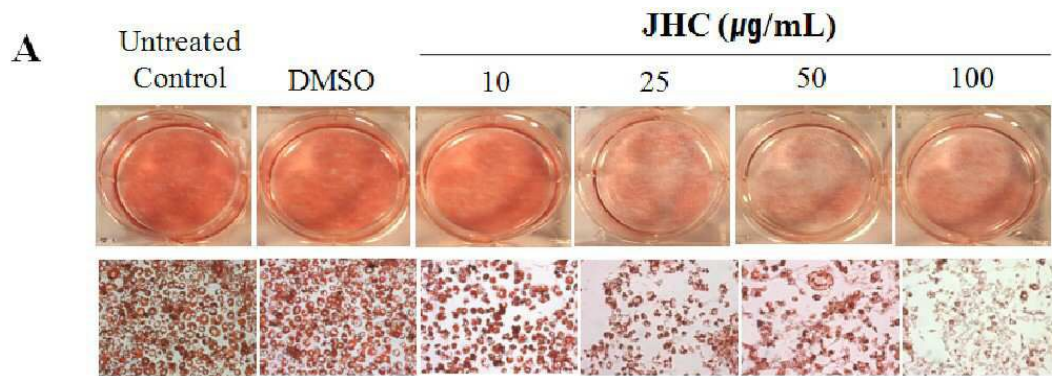
[0045] 웨스턴 블랏 분석

[0046] 세포를 100 mm 디쉬 플레이트에 시딩하였다. 지방세포 분화 및 칠엽수 수피 추출물 처리는 위에서 기재된바와 같이 수행하였다. 세포 추출물은 단백질 추출용액 (PRO-PREP, Intron Biotechnology, Sungnam, Korea)을 가하여 제조하였다. 세포 용균액 내의 단백질 함량은 브래드포드 방법으로 결정하였다. 단백질 (20 µg)을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 0.1% Tween 20을 포함하는 TBS에 용해한 5% 탈지분유로 블로킹하였다. 블랏은 PPARγ (1:200) 및 C/EBPα (1:5000)를 포함하는 일차 항체 및 블로킹 용액 내의 염소 항-마우스 IgG-HRP 이차항체로 4 °C에서 오버나잇 배양하였다. 목표 단백질은 ECL 웨스턴 블랏팅 탐지 시약 (GE Healthcare, Seoul, South Korea)으로 탐지하였다.

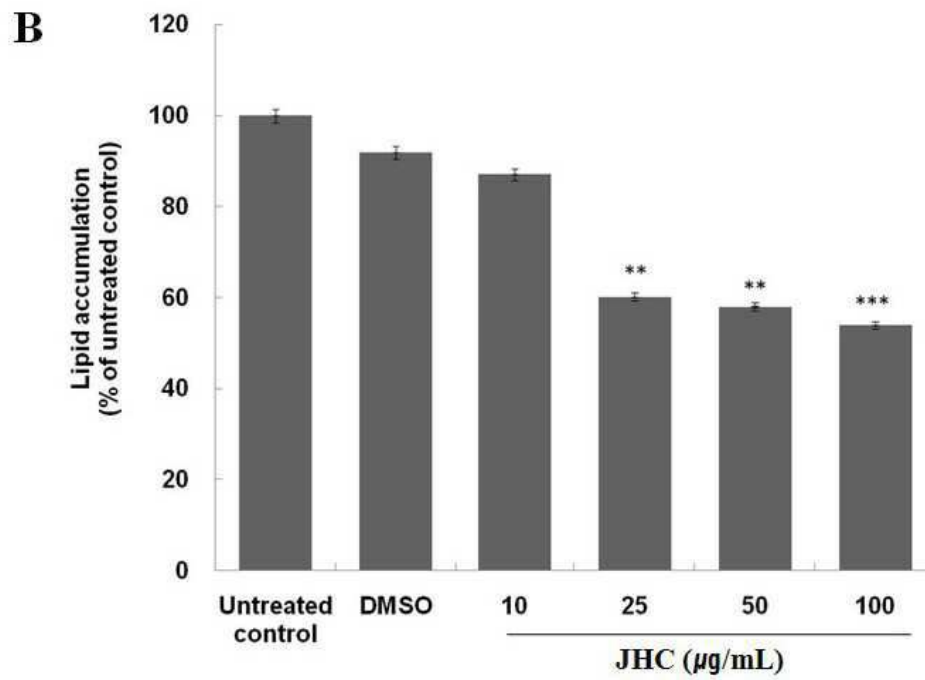
- [0047] **통계 분석**
- [0048] 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성을 결정하기 위해 데이터는 student's *t* test를 이용하여 분석하였다. $p < 0.05$ 값은 통계적으로 유의미한 것으로 판단되었다.
- [0049] <제조예 1> 캡슐제
- [0050] 칠엽수 수피 추출물 100 mg, 옥수수 전분 100 mg, 유당 100 mg, 스테아린산 마그네슘 2 mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0051] <제조예 2> 주사제
- [0052] 통상의 주사제 제조방법에 따라 칠엽수 수피 추출물 100 mg을 주사용 증류수에 용해하고 pH 조절제로 pH를 7.5로 조절한 다음, 주사용수 10 ml, pH 조절제 5 mg을 주사용 증류수로 2 ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균시켜서 주사제를 제조하였다.
- [0053] <제조예 3> 선식
- [0054] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 만들었다. 김정콩, 김정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 만들었다. 본 발명의 칠엽수 수피 추출물을 진공 농축기에서 감압 농축하고, 분무 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 대황 추출물 건조 분말을 얻었다. 상기와 같이 제조한 곡물, 종실 및 칠엽수 수피 추출물의 건조 분말을 다음의 비율로 배합하여 과립을 만들었다.
- [0055] 곡물류 : 현미 30 중량%, 울무 15 중량%, 보리 20 중량%, 찹쌀 9 중량%,
- [0056] 종실류 : 들깨 7 중량%, 김정콩 8 중량%, 김정깨 7 중량%,
- [0057] 칠엽수 수피 추출물 건조 분말 4 중량%
- [0058] <제조예 4> 건강 음료
- [0059] 꿀 0.26중량%, 치옥토산아미드 0.0002중량%, 니코틴산아미드 0.0004중량%, 엽산리보플라빈나트륨 0.0001중량%, 엽산피리독신 0.0001중량%, 이노시톨 0.001중량%, 오르트산 0.002 중량% 및 물 98.7362중량%와 본 발명의 칠엽수 수피 추출물 1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 건강 음료를 제조하였다.
- [0060] <제조예 5> 건강보조식품
- [0061] 스피루리나 55중량%, 구아검효소 분해물 10중량%, 비타민 B₁ 엽산염 0.01중량%, 비타민 B6 엽산염 0.01중량%, DL-메티오닌 0.23중량%, 스테아린산 마그네슘 0.7중량%, 유당 22.2중량% 및 옥수수전분 1.85중량%와 본 발명의 칠엽수 수피 추출물 10중량%를 배합하여 통상의 방법으로 정제형 건강보조식품을 제조하였다.
- [0062] 위와 같이, 본 발명의 구체적인 제형예를 설명하였지만 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련된 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

도면

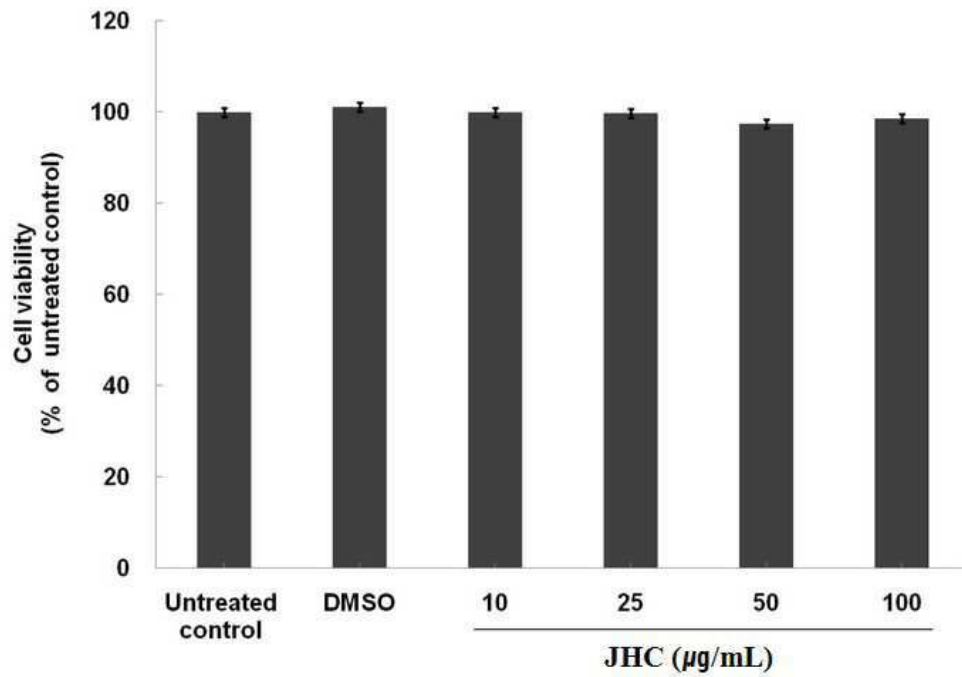
도면1a



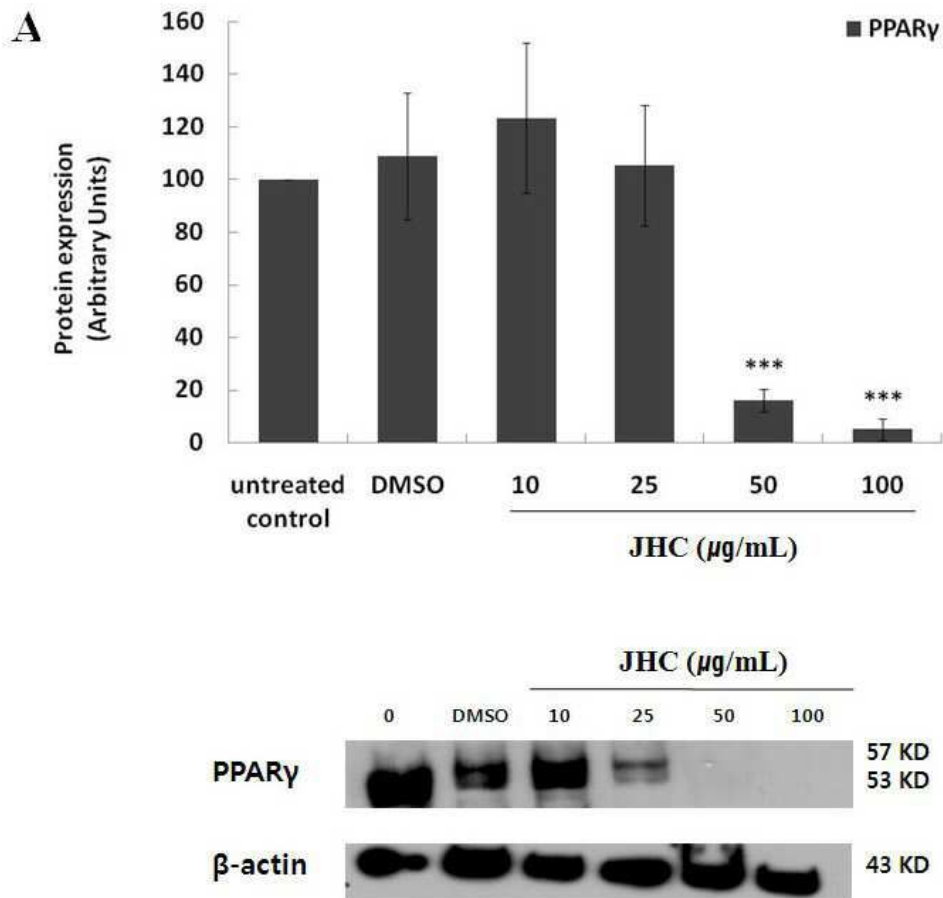
도면1b



도면2



도면3a



도면3b

