



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월28일
(11) 등록번호 10-1933482
(24) 등록일자 2018년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0086555

(22) 출원일자 2017년07월07일

심사청구일자 2017년07월07일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100120614 A*

KR1020160138927 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

주식회사 장생도라지

경상남도 진주시 금곡면 정자천로15번길 5

(72) 발명자

정혜광

대전광역시 유성구 반석서로 98, 609동 1102호 (반석동, 반석마을6단지아파트)

김용안

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 405동 803호(전민동, 엑스포 4단지 아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 염금희

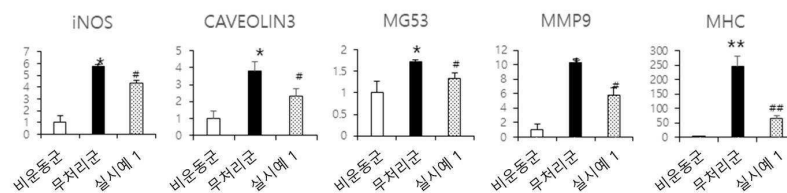
(54) 발명의 명칭 길경 사포닌 분획물을 포함하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 조성물

(57) 요약

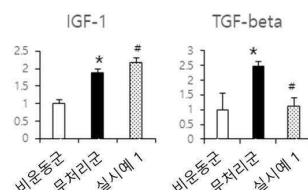
본 발명은 길경 사포닌 분획물을 포함하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것으로, 상기 길경 사포닌 분획물은 운동성 근육 손상 시 증가되는 혈액학적 지표인 LDH, CK 및 CRP의 수치를 낮추고, 근육 손상 관련 인자인 iNOS, Caveolin3, MG53, MMP9 및 MHC와 근육성장 억제에 관련되어 있는 TGF-β의 발현량을 낮추며, 골격근 성장에 관련된 IGF-1 발현량은 증가시키므로, 운동에 의한 근육 손상이 예방되는 효과가 우수하여, 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

A. 근손상 관련인자



B. 골격근 성장(IGF-1) 및 억제(TGF-beta) 인자



(52) CPC특허분류

A23V 2200/316 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

A23V 2300/18 (2013.01)

(72) 발명자

진순우

대전광역시 유성구 문화원로 119, 1동 707호(봉명동, 봉명시티빌)

정영철

경상남도 진주시 초장로14번길 27, 101동 1702호
(초전동, 푸르지오아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0443713

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단

연구사업명 중소기업청 기술개발사업 (도약)

연구과제명 길경 유래 사포닌을 이용한 근 기능 개선을 통한 운동수행능력 향상 소재개발 및 상품화

기 여 율 1/1

주관기관 (주) 장생도라지

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

디아피-플라티코사이드 E(deapi-platycoside E), 플라티코사이드 E(platycoside E), 플라티코딘 D₃(platycodin D₃), 플라티콘산 A(platyconic acid A), 플라티코딘 D₂(platycodin D₂) 및 플라티코딘 D(platycodin D)를 20~50 중량%로 함유하는 길경 사포닌 분획물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 길경 사포닌 분획물은 길경을 알코올 또는 알코올 수용액으로 추출한 길경 추출물을 유기용매 분획 및 크로마토그래피로 정제한 분획물인 것을 특징으로 하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 알코올은 C1 내지 C4의 저급 알코올인 것을 특징으로 하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 건강기능식품의 제형은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 길경 사포닌 분획물을 포함하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 운동은 근력 증진, 체중 조절, 부상 예방, 재활 및 심혈관 질환, 당뇨, 비만, 고혈압과 같은 만성질환을 예방하기 위한 효과적인 수단으로 인정되어, 운동에 참여하는 인구가 지속적으로 증가하고 있다(Warburton, D. E. et al., CMAJ., 174(6), 801-809, 2006).

[0003] 그러나, 근육의 수축을 동반하는 신장성 근육 활동(eccentric muscle activity)을 포함한 익숙하지 않은 운동, 고강도 운동 또는 신체 조정 능력 수준을 고려하지 않은 과도한 운동으로 인한 지나친 자극은 신체에 스트레스를 가져다주며, 근육 내부에 생화학적 또는 생리적인 변화를 유발하여 근육 손상을 유발할 수 있다(Baroni, B. M. et al., Eur J Appl Physiol., 110(4), 789-796, 2010; Byrne, C. et al., Scand J Med Sci Sports., 11(3), 134-140, 2001; Byrne, C. et al., Sports Med., 34(1), 49-69, 2004; Howatson, G. et al., Sports Med., 38(6), 483-503, 2008; Proske, U. et al., J Physiol., 537(Pt 2), 333-345, 2001).

[0004] 운동으로 인한 근육 손상은 근육통, 혈중 근육 효소의 활성도 증가, 관절가동범위의 제한, 근 수행력의 감소 및 부종 등의 임상적 증상으로 판단한다(Appell, H. J. et al., Sports Med., 13(2), 108-15, 1992; Cleak, M. J.

et al., Br J Sports Med., 26(4), 267272, 1992).

- [0005] 근육 손상시 가장 흔한 생화학적 지표는 크레아틴 키나아제(creatine kinase, CK)와 젖산 탈수소 효소(lactate dehydrogenase, LDH)이며, 무산소성 운동뿐만 아니라 유산소성 운동에 의해서도 증가한다. CK는 에너지 대사와 관계하여 크레아틴(creatine)과 크레아틴인산(creatine phosphate)과의 전환을 촉매하며, LDH는 당질의 이화 및 동화작용의 평형을 이루는 주요소로 피루빈산(pyruvate)과 젖산(lactate) 사이의 상호 전환을 촉매한다. 특히, 혈청 CK는 운동과 관련이 있어 골격근에 많이 존재하고, 운동에 의한 변화가 크며 운동 강도, 시간, 훈련의 양과 밀접한 관련이 있어 혈청 효소 중 운동 시 제일 많이 측정되는 효소이다(김정우, 석사학위논문, 단국대학교 스포츠과학대학원, 2005; 박진영, 스피닝, 한양대학교 교육대학원, 석사학위논문, 2015; Lijnen, P. et al., Int J Sports Med., 9(2), 108-113, 1988).
- [0006] 운동으로 인한 일시적인 근육 손상은 심각한 상태가 아니며 자기활동제한질환(self-limiting disorder)으로서 특별한 치료가 요구되지 않는다. 그러나, 운동 자극이 심한 경우, 근육통과 근경직이 심한 경우, 기능 장애가 있는 경우, 및, 특히, 격렬한 운동 후 근육이 재생할 수 있는 충분한 시간적 여유가 주어지지 않는 시합이 연일 계속되는 스포츠 상황에서는 적절한 처치가 뒤따라야 한다.
- [0007] 운동 수행에 의해 발생되는 근육 손상 및 통증을 예방하거나 회복을 촉진하기 위한 방법으로서, 준비운동, 스트레칭, 마사지 등이 일반적이며, 이 외에도 단백질 보충제(Esmarck, B. et al., J Physiol., 535(Pt 1), 301-311, 2001; Evans, W. J., J Am Coll Nutr., 23(6 Suppl), 601S-609S, 2004), 비스테로이드성 소염제(NSAIDs) 등의 약물 요법(kuipers et al., 1985; Donnelly et al., 1990), 전기 자극 요법(Craig, J. A. et al., Pain, 67(2-3), 285-289, 1996), 초음파(Bryant, J. et al., Report to the Development and Evaluation Committee, 90, 121, 1998; Falconer, J. et al., Arthritis Care Res., 3(2), 85-91, 1990), 냉각요법(Chesterton, L. S. et al., Arch Phys Med Rehabil., 83(4), 543-549, 2002; Swenson, C. et al., Scand J Med Sci Sports., 6(4), 193-200, 1996) 등이 알려져 있다. 또한, 최근에는 안전성이 보장된 천연물을 이용하여 기능성 보조제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으나 아직 미비한 실정이므로, 운동수행에 의해 발생되는 근육 손상과 통증을 효과적으로 예방하면서도 부작용이 없는 보조제에 대한 연구가 요구된다.
- [0008] 길경(*Platycodon grandiflorum*)은 초롱꽃과의 도라지의 뿌리 또는 주피를 제거하여 만든 약재로, 뿌리가 단단하고 곧기 때문에 길경이라는 이름이 붙여졌다. 한국, 일본, 중국 등 동아시아 등지에 많이 분포하고 있으며, 주된 성분으로는 사포닌(saponin) 계열이 잘 알려져 있다.
- [0009] 길경 사포닌 성분으로서 플라티코디게닌(platycodigenin)의 배당체로 플라티코딘(platycodin) A, C, D, D2와 2종의 모노아세테이트 플라티코딘 D3, 디아피(deapi)-플라티코딘 D3가 보고되었으며, 폴리갈락산(polygalactic acid)의 배당체로 폴리갈라신(polygalacin) D와 2종의 모노아세테이트, 폴리갈라신 D2와 모노아세테이트가 있고, 플라티코젠산(platycogenic acid) A의 배당체로 메틸 플라티코네이트 A, 메틸-2-메톡시 플라티코네이트 A 등 10 여종의 트리테르펜 사포닌이 보고되었다. 그 외 아글리콘으로 플라티코젠산 B 및 C가 보고된 바 있다(Ouyang et al., 2011).
- [0010] 길경의 생리활성으로는 간경화 억제(Choi, J. H. et al., Food Chem Toxicol., 56, 231-239, 2013), 항비만 및 인슐린 저항성 완화(Lee, C. E. et al., Evid Based Complement Alternat Med., 2012, 759143, 2012), 알레르기성 아토피 피부염 억제(Choi, J. H. et al., Environ Toxicol Pharmacol. 33(3), 446-452, 2012), 항암 효과(Hong, S. H. et al., Journal of Life Science, 24(11), 1244-1251, 2014) 등이 보고되었다.
- [0011] 한편, 천연물을 이용한 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 조성물과 관련된 선행문헌으로서, 한국공개특허 제10-2009-0064398호에는 근육 건강을 촉진시키기 위한 올리브 추출물을 개시하였고, 한국공개특허 제10-2017-0002443호에는 커큐민 조성물 및 이의 용도를 개시하였고, 한국공개특허 제10-2013-0132473호에는 운동능을 향상시키는 스포츠 음료 및 이의 음용 방법이 개시된 바 있다. 또한, 길경에 대한 선행문헌으로서, 한국공개특허 제10-2016-0138927호에는 길경 추출물을 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물이 개시되었으며, 한국등록특허 제10-1034596호에는 근력약화, 근위축, 구음장애, 연하장애의 증상을 개선, 지연시키기 위한 조성물을 개시하였으나, 본 발명과 같이 길경 사포닌 분획물이 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선 효과가 있음을 확인한 이전 보고는 아직 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2009-0064398호, 근육 건강을 촉진시키기 위한 올리브 추출물, 2009년 06월 18일, 공개.
- (특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2017-0002443호, 커큐민 조성물 및 이의 용도, 2017년 01월 06일, 공개.
- (특허문헌 0003) 한국공개특허 제10-2013-0132473호, 운동능을 향상시키는 스포츠 음료 및 이의 음용 방법, 2013년 12월 04일, 공개.
- (특허문헌 0004) 한국공개특허 제10-2016-0138927호, 길경 추출물을 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물, 2016년 12월 06일, 공개.
- (특허문헌 0005) 한국등록특허 제10-1034596호, 근력약화, 근위축, 구음장애, 연하장애의 증상을 개선, 지연시키기 위한 조성물, 2011년 05월 04일, 등록.

비특허문헌

- [0013] (비특허문헌 0001) 김정우, 규칙적인 운동이 여성노인의 혈장 LDH 동위효소와 CPK 농도 및 체력에 미치는 영향, 석사학위논문, 단국대학교 스포츠과학대학원, 2005.
- (비특허문헌 0002) 박진영, 스피닝, 트레드밀, 사이클 일회성 운동이 비만 여성의 혈중지질, 근육 손상 지표에 미치는 영향, 한양대학교 교육대학원, 석사학위논문, 2015.
- (비특허문헌 0003) Appell, H. J. et al., Exercise, muscle damage and fatigue, Sports Med., 13(2), 108-15, 1992.
- (비특허문헌 0004) Azad, M. et al., Effect of acute and chronic eccentric exercise on FOXO1 mRNA expression as fiber type transition factor in rat skeletal muscles, Gene, 584(2), 180-184, 2016.
- (비특허문헌 0005) Baroni, B. M. et al., Low level laser therapy before eccentric exercise reduces muscle damage markers in humans, Eur J Appl Physiol., 110(4), 789-796, 2010.
- (비특허문헌 0006) Byrne, C. et al., Characteristics of isometric and dynamic strength loss following eccentric exercise-induced muscle damage, Scand J Med Sci Sports., 11(3), 134-140, 2001.
- (비특허문헌 0007) Byrne, C. et al., Neuromuscular function after exercise-induced muscle damage-theoretical and applied implications, Sports Med., 34(1), 49-69, 2004.
- (비특허문헌 0008) Bryant, J. et al., therapeutic ultrasound in physiotherapy, Report to the Development and. Evaluation Committee, 90, 121, 1998.
- (비특허문헌 0009) Cai, C. et al., Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin, J Biol Chem., 284(23), 15894-15902, 2009.
- (비특허문헌 0010) Chesterton, L. S. et al., Skin temperature response to cryotherapy, Arch Phys Med Rehabil., 83(4), 543-549, 2002.
- (비특허문헌 0011) Choi, J. H. et al., Platycodi Radix suppresses development of atopic dermatitis-like skin lesions, Environ Toxicol Pharmacol. 33(3), 446-452, 2012.
- (비특허문헌 0012) Choi, J. H. et al., Platycodi Radix attenuates dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes, Food Chem Toxicol., 56, 231-239, 2013.
- (비특허문헌 0013) Cleak, M. J. et al., Muscle soreness, swelling, stiffness and strength loss after intense eccentric exercise, Br J Sports Med., 26(4), 267-272, 1992.
- (비특허문헌 0014) Craig, J. A. et al., Lack of effect of transcutaneous electrical nerve stimulation upon experimentally induced delayed onset muscle soreness in humans, Pain, 67(2-3), 285-289, 1996.
- (비특허문헌 0015) Esmarck, B. et al., Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans, J Physiol., 535(Pt 1), 301-311, 2001.

- (비특허문헌 0016) Evans, W. J., Protein nutrition, exercise and aging, J Am Coll Nutr., 23(6 Suppl), 601S-609S, 2004.
- (비특허문헌 0017) Falconer, J. et al., Therapeutic ultrasound in the treatment of musculoskeletal conditions, Arthritis Care Res., 3(2), 85-91, 1990.
- (비특허문헌 0018) Glover, L. et al., Dysferlin in membrane trafficking and patch repair, Traffic, 8(7), 785-794, 2007.
- (비특허문헌 0019) Hong, J. et al., Myosin heavy chain is stabilized by BCL-2 interacting cell death suppressor (BIS) in skeletal muscle, Exp Mol Med., 48, e225, 2016.
- (비특허문헌 0020) Hong, S. H. et al., Effects of Platycodon grandiflorum on the Induction of Autophagy and Apoptosis in HCT-116 Human Colon Cancer Cells, Journal of Life Science, 24(11), 1244-1251, 2014.
- (비특허문헌 0021) Howatson, G. et al., The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage, Sports Med., 38(6), 483-503, 2008.
- (비특허문헌 0022) Koh, T. J., Physiology and mechanisms of skeletal muscle damage, Skeletal Muscle Damage and Repair, 3-12, 2008.
- (비특허문헌 0023) Lee, C. E. et al., Long-Term Consumption of Platycodi Radix Ameliorates Obesity and Insulin Resistance via the Activation of AMPK Pathways, Evid Based Complement Alternat Med., 2012, 759143, 2012.
- (비특허문헌 0024) Lijnen, P. et al., Indicators of cell breakdown in plasma of men during and after a marathon race, Int J Sports Med., 9(2), 108-113, 1988.
- (비특허문헌 0025) Lin, H. F. et al., Panax ginseng and salvia miltiorrhiza supplementation abolishes eccentric exercise-induced vascular stiffening: a double blind randomized control trail, BMC Complement Altern Med., 16, 168, 2016.
- (비특허문헌 0026) Proske, U. et al., Muscle damage from eccentric exercise : mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications, J Physiol., 537(Pt 2), 333-345, 2001.
- (비특허문헌 0027) Swenson, C. et al., Cryotherapy in sports medicine, Scand J Med Sci Sports., 6(4), 193-200, 1996.
- (비특허문헌 0028) Warburton, D. E. et al., Health benefits of physical activity: the evidence, CMAJ., 174(6), 801-809, 2006.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 길경 사포닌 분획물을 포함하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 길경 사포닌 분획물을 포함하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것으로, 상기 길경 사포닌 분획물은 길경을 알코올 또는 알코올 수용액으로 추출한 길경 추출물을 유기용매 분획 및 크로마토그래피로 정제한 분획물이다.
- [0016] 보다 구체적으로, 상기 길경 사포닌 분획물은
- [0017] (1공정) 길경을 알코올 또는 알코올 수용액으로 추출하여 길경 추출물을 얻는 단계;
- [0018] (2공정) 상기 1공정의 길경 추출물을 물에 현탁하고 이온교환 크로마토그래피에 가한 다음, 알코올 수용액으로

분획하여 1차 길경 조사포닌을 얻는 단계;

- [0019] (3공정) 상기 1차 길경 조사포닌을 물에 현탁하고 역상 크로마토그래피에 가한 다음, 알코올 수용액으로 분획하여 2차 길경 조사포닌을 얻는 단계;
- [0020] (4공정) 상기 2차 길경 조사포닌에 알코올을 더하고 여과한 다음, 여액에 에틸아세테이트를 더하고 재여과하여 3차 길경 조사포닌을 얻는 단계; 및
- [0021] (5공정) 상기 3차 길경 조사포닌을 물에 현탁하고 역상 크로마토그래피에 가하여 알코올 수용액으로 분획한 다음, 농축 및 순상 크로마토그래피로 분획하여 길경 사포닌 분획물을 얻는 단계; 로 제조한다.
- [0022] 상기 길경 사포닌 분획물의 제조공정에서 사용되는 알코올은 C1 내지 C4의 저급 알코올이며, 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올로는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등을 이용할 수 있다.
- [0023] 또한, 길경 사포닌 분획물의 제조공정에서 사용되는 크로마토그래피는 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography), 역상 크로마토그래피(reversed phase chromatography), 순상 크로마토그래피(normal phase chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 등을 이용할 수 있다.
- [0024] 상기 이온교환 크로마토그래피는 이온교환수지가 충전 되어 있는 컬럼 크로마토그래피로, 상기 이온교환수지는 디아이온 HP-20(diaion HP-20), SP825, AXT204, XAD1600T, MN200, SP70, SP710 등에서 선택하여 사용할 수 있고, 바람직하게는 디아이온 HP-20이다.
- [0025] 또한, 상기 길경 사포닌 분획물의 구체적인 제조공정에 있어서, 상기 1공정에서의 길경을 추출하는 시간은 특별히 제한되는 것은 아니며, 추출용 기기로는 통상의 추출기기, 초음파분쇄추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.
- [0026] 상기 4공정은 불필요한 고형분을 제거하기 위하여 에틸아세테이트를 더하고 침전한 다음 상층액만 얻은 후 재여과하는 단계를 포함하며, 상기 여과시 먼, 나일론 등을 이용하여 입자를 걸러 내거나 한외여과, 냉동여과법, 원심분리법 등을 사용하는 것도 가능하며, 여과에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합한 방법을 이용할 수 있다.
- [0027] 상기 과정을 통해 얻은 길경 사포닌 분획물은, 디아피-플라티코사이드 E(deapi-platycoside E), 플라티코사이드 E(platycoside E), 플라티코딘 D₃(platycodin D₃), 플라티콘산 A(platyconic acid A), 플라티코딘 D₂(platycodin D₂) 및 플라티코딘 D(platycodin D)를 20~50중량%로 함유하며, 바람직하게는 25~35중량%로 함유한다. 그러나, 상기 범위를 벗어나서 길경 사포닌 분획물에 디아피-플라티코사이드 E, 플라티코사이드 E, 플라티코딘 D₃, 플라티콘산 A, 플라티코딘 D₂ 및 플라티코딘 D이 20중량% 미만으로 포함되는 경우, 운동성 근육 손상이 예방 또는 개선되는 효과가 낮아 바람직하지 않고, 50중량%를 초과하는 경우에는 제조비용 대비 운동성 근육 손상이 예방 또는 개선되는 효과 상승 폭이 크지 않아, 경제적이지 않으므로 바람직하지 않다.
- [0028] 또한, 이때 상기 디아피-플라티코사이드 E는 5~15중량%, 플라티코사이드 E는 15~30중량%, 플라티코딘 D₃는 10~20중량%, 플라티콘산 A는 10~20중량%, 플라티코딘 D₂는 5~15중량% 및 플라티코딘 D는 20~40중량%가 혼합되어, 길경 사포닌 분획물에 20~50중량%로 포함된다.
- [0029] 본 발명은 길경 사포닌 분획물을 포함하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하며, 상기 건강기능식품은 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 또는 가공한 식품을 지칭하는 것으로, 예를 들어 건강보조식품, 기능성 식품, 영양제, 보조제 등을 모두 포함한다.
- [0030] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제가 첨가될 수 있다. 상기 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다. 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합

성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g이다. 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 길경 사포닌 분획물을 포함하는 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것으로, 상기 길경 사포닌 분획물은 운동성 근육 손상 시 증가되는 혈액학적 지표인 LDH, CK 및 CRP의 수치를 낮추고, 근육 손상 관련 인자인 iNOS, Caveolin3, MG53, MMP9 및 MHC와 근육성장 억제에 관련되어 있는 TGF- β 의 발현량을 낮추며, 골격근 성장에 관련된 IGF-I 발현량은 증가시키므로, 운동에 의한 근육 손상이 예방되는 효과가 우수하여, 운동성 근육 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명 실시예 1을 처리했을 때의 iNOS, Caveolin3, MG53, MMP9, MHC, TGF- β 및 IGF-I에 대한 mRNA 발현량 측정 결과이다.

도 2는 동물모델에서 대조군(도 2A) 및 본 발명 실시예 1(도 2B)을 투여한 다음, 운동성 근육 손상을 유도하고 비복근의 횡단면을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 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.

[0034] <실시예 1. 길경 사포닌 분획물의 제조>

[0035] 사포닌의 손실을 최소화하기 위해서 흐르는 물에 가볍게 세척하고 분쇄한 길경((주) 장생도라지) 6kg에 70%(v/v) 에탄올 수용액 60ℓ를 더하여 일주간 상온에서 정치시킨 다음 여과지로 여과하였다. 상기 과정에서 획득한 길경 70% 에탄올 수용액 추출물을 감압농축 한 후 물에 현탁시키고, 이온교환 컬럼 크로마토그래피(Diaion HP-20 resin 사용)에 흡착시켰다. 이후, 물로 충분히 씻어 당 화합물과 아미노산류들을 제거시킨 다음, 흡착되어 있는 사포닌성분과 기타물질들을 90%(v/v) 에탄올 수용액으로 용출시킴으로써 순도 60~80%의 1차 길경 조사포닌(crude-saponins) 1,257g을 얻었다.

[0036] 상기 과정에서 얻어진 1차 길경 조사포닌을 정제수 12ℓ에 현탁하고 역상 컬럼 크로마토그래피(C18-resin)에 흡착시킨 다음, 물과 3%(v/v) 아세트니트릴 수용액 60ℓ로 충분히 씻어 당 화합물과 아미노산류들을 제거하였다. 이후, 흡착되어 있는 사포닌성분과 기타 물질들을 90%(v/v) 메탄올 수용액으로 용출시켜 순도 90% 이상의 2차 길경 조사포닌 143.3g을 얻었다. 상기 2차 길경 조사포닌을 에탄올 1.5ℓ에 녹인 후 여과지로 여과하여 얻은 여액에 에틸아세테이트 15ℓ를 더하고 교반하였다. 교반 후, 정치하여 고형분이 석출되기를 기다린 다음, 다시 재여과하여 3차 길경 조사포닌 135.75g을 얻었다.

[0037] 상기 3차 길경 조사포닌을 증류수로 현탁하고 역상 크로마토그래피에 흡착시킨 후, 40%(v/v) 메탄올 수용액, 50%(v/v) 메탄올 수용액, 60%(v/v) 메탄올 수용액, 70%(v/v) 메탄올 수용액 및 80%(v/v) 메탄올 수용액의 각 용매를 10ℓ씩 사용하여 용출시켰다. 상기 과정에서 얻어진 메탄올 수용액 농도별 분획물을 농축하고 건조시킨 후 순상 크로마토그래피(silica)를 이용하여 분획하고 그 분획물을 수득함으로써 본 발명 실시예 1의 길경 사포닌 분획물을 얻었다.

[0038] 상기 실시예 1의 기능성분을 HPLC로 분석한 결과를 표 1 및 도 1에 나타내었으며, 또한, 하기 비교예 1의 과정으로 제조된 길경 열수 추출물의 기능성분을 표 1에 나타내었다.

표 1

[0039]

조건	DPE	PE	PD ₃	PA	PD ₂	PD	6 saponins
실시예 1	31.51 ^a ±0.02 ^b	72.90 ±0.02	43.81 ±0.04	37.88 ±0.07	33.56 ±0.06	88.76 ±0.06	308.41 ±0.12
비교예 1	1.05 ^a ±0.01 ^b	2.41 ±0.01	1.00 ±0.01	1.08 ±0.03	0.87 ±0.00	1.31 ±0.00	7.73 ±0.05
DPE : deapioplatycoside E, PE : platycoside E, PD ₃ : platycodin D ₃ , PA : platyconic acid A, PD ₂ : platycodin D ₂ , PD : platycodin D ^a : unit of mg/g, ^b : standard deviation(n=3)							

[0040]

상기 표 1을 참고하면, 본 발명의 길경 사포닌 분획물인 실시예 1은 상기 6가지 사포닌의 함량이 308.41mg/g로 포함되어 있었으나, 길경 열수 추출물인 비교예 1은 상기 6가지 사포닌의 함량이 7.73mg/g로 포함되어 있었다. 또한, 상기 표 1에는 나타나지 않았으나, 비교예 2의 길경 알코올 추출물의 경우에는 상기 6가지 사포닌의 함량이 15mg/g 내외로 포함되어 있어, 본 발명의 길경 사포닌 분획물은 길경 열수 추출물 및 길경 알코올 추출물에 비해, 기능성분을 다량으로 함유하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0041]

<비교예 1. 길경 열수 추출물의 제조>

[0042]

사포닌의 손실을 최소화하기 위해서 흐르는 물에 가볍게 세척하고 분쇄한 길경((주) 장생도라지) 6kg에 정제수 90ℓ를 더하여 80℃에서 6시간 동안 추출한 후 여과하여 길경 열수 추출물인 비교예 1을 얻었다.

[0043]

<비교예 2. 길경 알코올 추출물의 제조>

[0044]

사포닌의 손실을 최소화하기 위해서 흐르는 물에 가볍게 세척하고 분쇄한 길경((주) 장생도라지) 6kg에 70%(v/v) 에탄올 수용액 60ℓ를 더하여 일주간 상온에서 정치시킨 다음 여과지로 여과하고, 농축하여 길경 70% 에탄올 수용액 추출물인 비교예 2를 얻었다.

[0045]

<실험예 1. 근육 손상 지표 확인>

[0046]

탈진 트레드밀 운동에 의한 신장성 근육 수축에 유도된 근육 손상시, 증가되는 혈액학적 지표로 CRP(C-Reactive Protein), LDH(lactate dehydrogenase) 및 CK(creatine kinase)가 있으며(Azad, M. et al., Gene, 584(2), 180-184, 2016; Lin, H. F. et al., BMC Complement Altern Med., 16, 168, 2016; Koh, T. J., Skeletal Muscle Damage and Repair, 3-12, 2008), 근육 손상 관련 표적 유전자로 iNOS(inducible nitric oxide synthase), Caveolin-3, MG53(mitsugmin 53), MMP9(matrix metalloproteinase 9), MHC(myosin heavy chain), TGF-β(transforming growth factor-beta) 및 IGF-I(insulin growth factor-I)이 있다(Cai, C. et al., J Biol Chem., 284(23), 15894-15902, 2009; Glover, L. et al., Traffic, 8(7), 785-794, 2007; Hong, J. et al., Exp Mol Med., 48, e225, 2016). 이에, 본 발명의 길경 사포닌 분획물에 대한 운동성 근육 손상 보호 효과를 확인하기 위하여, 탈진 트레드밀 운동 후의 혈액학적 지표에 대한 변화 및 근육 손상 관련 표적 유전자에 대한 분석을 실시하였다.

[0047]

먼저, 본 발명 실시예 1의 길경 사포닌 분획물에 대한 운동성 근육 손상 보호 효과를 확인하기 위하여, ICR 쥐를 대상으로 비임상시험을 실시하였다. 시험은 충남대학교 실험동물윤리위원회 승인(CNU-00684) 하에 진행하였다.

[0048]

1. 시험동물

[0049]

종, 계통 (공급처) : 쥐, ICR

[0050]

구입처 : (주)대한바이오링크, 충북 음성군 삼성면 덕호로 277

[0051]

구입시 동물수 (성별), 주령 및 체중범위 : 40마리(수컷), 7주령, 20-23±2g

[0052]

투여시 동물수 (성별), 주령 및 체중범위 : 30마리(수컷), 8주령, 21-23±1.5g

[0053]

2. 동물실 환경조건

- [0054] 설정온도 : $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- [0055] 습도 : $50 \pm 10\%$
- [0056] 조명시간 및 명암주기 : 12hr/day/night
- [0057] 조도 : 150-300 lux
- [0058] 사료 및 음수 : 실험동물용 귀사료 (Agribands Purina Korea Inc. Analysis Service of Central Laboratory: 경기도 평택시 장당동 627)를 자유 공급하고 여과 멸균된 정제수를 음수병 (500ml)에 넣어 자유 섭취 시켰다.

[0059] **3. 시험물질, 주요 시약 및 장비**

- [0060] 시험물질 : 하기 표 2와 같이 본 발명의 실시예 1 및 비교예 2는 4mg/kg의 농도로 사용하였다.

표 2

조건	투여용량	동물수
비운동군	-	10
대조군(PBS)	-	10
실시예 1	4mg/kg	10
비교예 2	4mg/kg	10

[0062] **4. 시험방법**

- [0063] 순화 및 동물선별 : 동물 구입 후 시험을 실시하는데 적합하고 건강한 동물을 선별하기 위하여 1주간의 순화기간을 두고 음수, 사료 섭취량을 측정하였고 정상적인 체중이 증가한 동물을 선별하였다.
- [0064] 투여방법 : 존테(sonde)를 사용하여 강제 위내 경구 투여로 1일 1회씩 총 2주간 실시하였다.
- [0065] 근육 손상 유도방법 : 신장성 트레드밀 운동은 트레드밀을 이용하여, -16° 의 경사도에서 16.67m/min의 속도로 3분간 적응 시킨 뒤, 3분 이후부터 70분 종료시까지 20m/min의 속도로 고정하여 신장성 근 손상을 유발시켰다.
- [0066] 부검 및 근육 손상 관련 인자 측정 : 근육 손상 유도 후 2시간 경과된 시점에서 심장채혈하고 근육 손상 관련 혈액 지표 분석을 위하여 자동혈액화학분석기(Toshiba TBA-40FR)를 이용하였으며, 해당 결과는 표 4에 나타내었다. 또한, 근육은 비복근을 적출하여 RNA 분석과 근육염색용으로 나누어 사용하였다.
- [0067] 다음으로, 근육 손상 관련 표적 유전자에 대한 분석을 위해, 해당 근육조직에서 RNAiso-reagent(TAKARA, JAPAN)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 total RNA를 분리하였다. 이후, Nano-drop(Thermo Scientific, USA)를 이용하여 260nm에서 RNA를 정량한 다음 total RNA 1 μg 을 취하여 cDNA 합성 키트로 역전사 시켰다. cDNA는 RT-PCR 증폭을 위한 주형으로 사용되었으며, 사용한 PCR 프라이머 서열(네오프로브, 한국)은 하기 표 3과 같고, mRNA 발현량은 도 1에 나타내었다.

표 3

	프라이머 서열
iNOS	Forward primer: 5'-CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT-3' Reverse primer: 5'-CAT TGG AAG TGA AGC GGT TCG-3'
Caveolin3	Forward primer: 5'-GTT GTC TAC ACT GCT GGG TG-3' Reverse primer: 5'-TAG CTC TTA ATG CAG GGC AC-3'
MG53	Forward primer: 5'-TCC TCA TGA AAT TCT GCC TGG TA-3' Reverse primer: 5'-GGA TAT CTA GCC TTG CCG GT-3'
MMP9	Forward primer: 5'-GCT GAA GCT CTG ATG TAC CC-3' Reverse primer: 5'-TGT GGG AGT TCC ATA GAG GG-3'
MHC	Forward primer: 5'-CTC AGG CTT CAA GAT TTG GTG G-3' Reverse primer: 5'-TTG TGC CTC TCT TCG GTC ATT-3'
TGF- β	Forward primer: 5'-ATA CGT CAG ACA TTC GGG AAG CAG TG-3' Reverse primer: 5'-AAT AGT TGG TAT CCA GGG CTC TCC G-3'
IGF-1	Forward primer: 5'-GCA CCA TCT TCA AGG GCA ATT TG-3' Reverse primer: 5'-AGG AAG GAC AAG GAG ACC AAG G-3'

18s	Forward primer: 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3' Reverse primer: 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'
-----	--

표 4

조건	운동성 근육 손상 시 혈액학적 지표에 대한 측정 값			운동성 근육 손상 억제율(%)		
	CRP (ng/ml)	LDH (U/ℓ)	CK (U/ml)	CRP	LDH	CK
비운동군	3.7±3.3	203.6±16.6	8.5±1.1	-	-	-
대조군(PBS)	15.5±1.8	438.5±11.0	16.7±1.8	0	0	0
실시에 1 (길경 사포닌 분 획물)	3.8±2.5	355.3±5.7	12.4±1.7	99.15	35.4	52.4
비교예 2 (길경 알코올 추 출물)	10.3±1.9	401.2±1.3	15.2±1.6	44	15.9	18.3

[수식]

$$\text{운동성 근육 손상 억제율(\%)} = 100 - \left(\frac{\text{실시에 측정 값} - \text{비운동군 측정 값}}{\text{대조군 측정 값} - \text{비운동군 측정 값}} \times 100 \right)$$

상기 표 4는 운동성 근육 손상을 유도한 후 CRP, LDH 및 CK를 측정한 값과 이를 상기 수식으로 계산하여 운동성 근육 손상 억제율(%)로 나타낸 결과로써, 길경 사포닌 분획물을 2주간 경구 투여한 다음 트레드밀을 이용한 70 분간의 신장성 운동을 실시하는 경우, 길경 알코올 추출물에 비해, 운동에 의한 근육 손상시 증가되는 혈액학적 지표(CRP, LDH 및 CK)의 수치를 억제하는 효과가 우수한 것임을 확인할 수 있었다.

또한, 도 1의 결과를 참고하면, 근육 손상 관련 유전자인 iNOS, Caveolin3, MG53, MMP9, MHC, TGF-β mRNA 발현량이 대조군(무처리군)에 비해 낮게 나타났고, IGF- I 은 대조군(무처리군)에 비해 증가하였다.

따라서, 상기 결과로부터, 길경 사포닌 분획물은 근육 손상의 예방 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

<실험예 2. 근섬유막의 손상 저해 효과를 위한 조직학적 확인>

길경 사포닌 분획물 투여에 따른 근육 손상 보호효과를 측정하기 위하여, 트레드밀을 이용한 신장성 운동을 70 분간 적용한 근육 손상 유도 적용 후, 운동 종료 2시간 경과 시점에 적출된 비복근을 10% 포르말린에 고정하였으며, 24시간 후 수세, 탈수, 투명, 파라핀 침투 시킨 후 파라핀 블록으로 포매 하였다. 이후, 적합한 모양으로 박절시켜 슬라이드에서 헤마톡실린-에오진 염색법으로 근육 조직의 형태 및 손상된 부위를 확인하여 도 2에 나타내었고, 손상된 조직의 면적은 Image J(NIH, USA)로 측정하여 표 5에 나타내었다.

표 5

조건	운동성 근육 손상 시 비복근의 횡단면에서 손상 면적					운동성 근육 손상 억제율(%)
	조직1 (μm^2)	조직2 (μm^2)	조직3 (μm^2)	조직4 (μm^2)	손상 총 면적(μm^2)	
대조군(PBS)	57165	35478	29831	10455	132929	0
실시에 1 (길경 사포닌 분 획물)	4752	871	426	1355	7401	82.03

도 2 및 표 5의 결과를 참고하면, 길경 사포닌 분획물을 2주간 경구 투여하는 경우, 대조군(무처리군)을 투여하는 경우에 비해, 운동으로 인한 근육 손상이 80% 이상 억제되었음을 확인할 수 있었다.

따라서, 본 발명의 길경 사포닌 분획물은 운동으로 인한 근육 손상을 예방하는 효과가 우수한 것임을 확인할 수

있었다.

[0080] <제제예 1. 산제의 제조>

[0081] 본 발명의 실시예 1(길경 사포닌 분획물) 2g, 유당 1g을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0082] <제제예 2. 정제의 제조>

[0083] 본 발명의 실시예 1(길경 사포닌 분획물) 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0084] <제제예 3. 캡슐제의 제조>

[0085] 본 발명의 실시예 1(길경 사포닌 분획물) 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0086] <제제예 4. 환제의 제조>

[0087] 본 발명의 실시예 1(길경 사포닌 분획물) 90mg, 찹쌀전분 5mg 및 정제수 5mg 및 흡습성을 저해하는 첨가제로서 텍스트린, 말토덱스트린, 옥수수전분, 미결정셀룰로오스(MCC)를 소량 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 100mg의 환제를 만들었다.

[0088] <제제예 5. 건강기능식품의 제조>

[0089] 본 발명의 실시예 1(길경 사포닌 분획물) 20g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화 마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

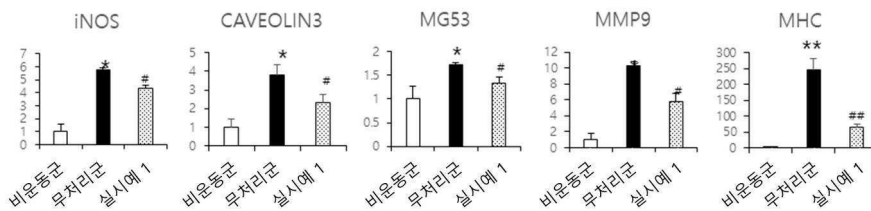
[0090] <제제예 6. 건강기능성 음료의 제조>

[0091] 본 발명의 실시예 1(길경 사포닌 분획물) 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

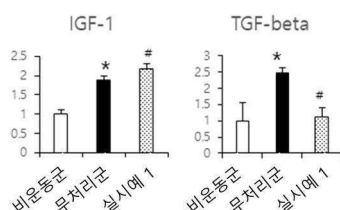
도면

도면1

A. 근손상 관련인자



B. 골격근 성장(IGF-1) 및 억제(TGF-beta) 인자



도면2

