



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0068221
(43) 공개일자 2017년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/70 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/70 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0175159
(22) 출원일자 2015년12월09일
심사청구일자 2015년12월09일

(71) 출원인
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교 천안캠퍼스내(안서동)
(72) 발명자
강현
대한민국 31053 충청남도 천안시 서북구 성거읍 석문길 16 로하스타운 103동 401호
(74) 대리인
한양특허법인

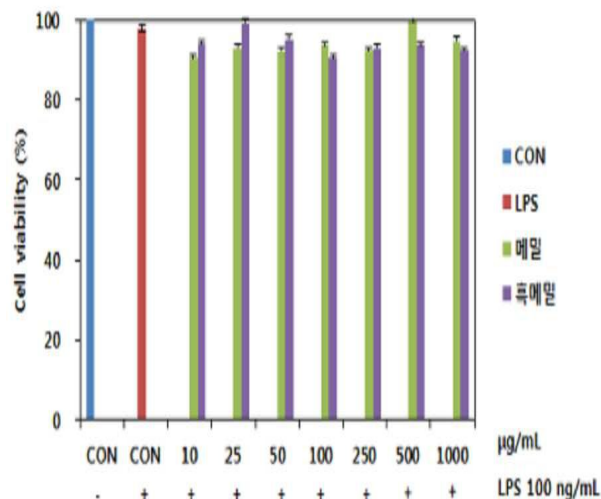
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 흑메밀 추출물을 포함하는 항산화 및 염증성 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 흑메밀 추출물을 포함하는 항염증성 및 염증성 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 BV-2 세포에 있어서 LPS-유발 유도성 질소 산화물 NO 생산을 완전히 억제시킬 수 있고, 이들 결과는 흑메밀 추출물이 효율적인 항염증제 및 신경퇴행성 질환의 치료제 후보물질로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0267961

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 한국산학연합회

연구사업명 산학협력기술개발사업(기업부설연구소 신규설치)

연구과제명 국내산 흑메밀을 이용한 고지혈증 예방 및 개선 기능성 소재 개발 및 제품화

기 여 율 1/1

주관기관 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

흑메밀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 유도성 질소 산화물 합성효소(iNOS) 및 NO 생산을 억제시키는 것을 특징으로 하는 염증성 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 흑메밀 알코올 추출물인 것을 특징으로 하는 염증성 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 미세아교세포에서 미세아교세포 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 염증성 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

흑메밀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 신경 퇴행성 질환 완화용 식품 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 식품은 음료, 젤리, 캔디, 껌 또는 유제품인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 7

흑메밀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 항염증용 약학 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 추출물은 흑메밀 추출물인 것을 특징으로 하는 항염증용 약학 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 조성물은 유도성 질소 산화물 NO 생산을 억제시키는 것을 특징으로 하는 항염증용 약학 조성물.

청구항 10

흑메밀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 항염증용 기능성 식품 조성물.

청구항 11

흑메밀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 항산화용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 흑메밀 추출물을 포함하는 항산화 및 염증성 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 메밀(*Fagopyrum esculentnm*)은 마디풀과에 속하는 일년초로 흑메밀은 타타리메밀(*tatary buckwheat*) 혹은 쓴메밀이라고도 불리며 히말라야의 고산지대와 인도북부, 네팔, 부탄, 중국북부, 동북부 등의 척박한 토양 및 냉랭한 기후조건의 지역에서 재배되고 있다.
- [0003] 메밀에는 lysine, arginine 등 필수 아미노산, 미네랄, 비타민, rutin, hyperin, quercitrin, quercetin 등의 flavonols 그리고 vitexin, isovitexin, orientin, isorientin등의 flavone과 그 밖의 많은 플라보노이드가 존재하는 것으로 알려져 있어 항당뇨, 위장병 개선, 고혈압개선, 심혈관질환, 모세혈관 건강 향상, 뇌혈관 장애 개선, 비만 예방, 항암효과, 항염효과 등 여러 질병예방과 치료에 도움을 주고 있는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 흑메밀의 총 페놀 함량은 일반메밀보다 약 2배가량 높고 플라보노이드의 함량은 일반메밀 50%, 흑메밀 95%로 흑메밀이 일반메밀보다 약 1.9배가량 높다. 여러 페놀화합물 중 특히 루틴(rutin)의 함량은 흑메밀이 일반 메밀보다 100배정도 높은 것으로 알려져 있다.
- [0005] 한편, Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), glutathione reductase, glutathione-S-transferase 등과 같이 인체 내에는 활성산소에 방어하는 항산화 효소를 가지고 있지만 산업화와 더불어 증가되는 각종 환경오염 물질, 흡연, 스트레스 등에 의해 인체 내의 항산화계의 역할만으로는 방어 체계가 초과되어 단백질 분해, DNA 손상 등이 유발된다
- [0006] 따라서, 항산화제로 butylated hydroxyanisole (BHA)과 butylated hydroxytoluene(BHT)와 같은 합성물질들이 개발되었으나, 이들의 경우 다량을 섭취하면 여러 가지 부작용을 나타낼 수 있어 천연으로부터 안전한 식이성 항산화물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다
- [0007] 한편, 염증은 감염으로 인한 인체 조직손상을 막는 방어기전으로 발진, 발열, 통증과 같은 증상을 수반한다. 이러한 염증반응이 장기간 지속적으로 반복될 경우 신경퇴행성질환과 같은 각종 만성질환과 암 등을 발병할 수 있는 요인이 된다.
- [0008] 대식세포(macrophage)는 인체 내 면역반응에서 일산화질소(nitric oxide; NO)와 프로스타글란딘(prostaglandin; PG)과 pro-inflammatory cytokine 등과 같은 염증매개물질 생성에 관여하고 이를 조절한다. 이러한 염증매개물질은 염증반응을 유도하며, 숙주의 면역반응이 적절하게 대응하지 못할 경우 염증성 질환을 유발한다.
- [0009] 관련 선행특허로 대한민국특허공개번호 제1020120011981호는 항염증 효과를 갖는 잠분 추출물 및 이를 포함하는 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 잠분 추출물은 헴 옥시게나제-1과 시르투인-1의 발현을 증대시켜 항염증 효과를 갖는다는 것이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 항염증성 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 염증성 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 흑메밀 추출물을 유효 성분으로 하는 염증성 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 유도성 질소 산화물 합성(iNOS) 및 NO 생산을 억제시키는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0014] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 추출물은 흑메밀 알코올 추출물인 것이 바람직하고, 에탄올 추출물인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 미세아교세포에서 미세아교세포 활성을 억제하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 또 본 발명은 흑메밀 추출물을 유효 성분으로 하는 염증성 신경 퇴행성 질환 완화용 식품 조성물을 제공한다.
- [0017] 또 본 발명은 흑메밀 추출물을 유효 성분으로 하는 항염증용 약학 조성물을 제공한다.

- [0018] 또 본 발명은 흑메밀 추출물을 유효 성분으로 하는 항염증용 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0019] 또 본 발명은 흑메밀 추출물을 유효 성분으로 하는 항산화용 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 흑메밀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0021] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0022] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 율활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 흑메밀 추출물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화 되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.
- [0025] 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제공한다.
- [0026] 본 발명은 또한 결핵 예방 및 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 상기 흑메밀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기 흑메밀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 결핵 예방 및 치료와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명은 포유동물에게 치료상 유효량의 흑메밀 추출물을 투여하는 것을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0028] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0029] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상의로 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서의 약제조성물 중 유효성분인 흑메밀 추출물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 증상, 투여방법 또는 예방목적에 따라, 체중 kg 당 6 내지 30을 일일 1회 내지 3회 분복할 수 있다. 특히 증상을 나타내는 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여 시간, 투여 방법, 배설율, 질환의 중

증도 등에 따라 당업자가 투여량을 변화시킬 수도 있다.

[0031] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 흑메밀 추출물을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명에 따른 산업 부산물인 흑메밀 추출물을 포함하는 제약 조성물은 BV-2 세포에 있어서 LPS-유발 유도성 질소 산화물 NO 생산을 완전히 억제시킬 수 있고, 이들 결과는 흑메밀 추출물이 효율적인 항염증제 및 신경퇴행성 질환의 치료제로 사용될 수 있음을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 메밀 추출물과 흑메밀 추출물의 polyphenol과 flavonoid 함량의 비교를 나타낸 그림,

도 2는 흑메밀 추출물의 세포생존율(BV-2 세포)을 나타낸 그림,

도 3은 흑메밀 추출물의 DPPH radical 소거능을 나타낸 그림,

도 4는 흑메밀 추출물의 nitrite의 생성 저해를 나타낸 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0035] 실시예 1: 흑메밀 추출

[0036] 흑메밀 추출시, 각 시료와 용매의 비가 1:10(w:v)로 흑메밀 100 g을 1 L의 에탄올로 72시간동안 상온에서 추출하고 시료를 여과하여 감압농축 후 동결건조하여 사용하였다.

[0037] 실시예 2.: 총 페놀 화합물 함량 비교

[0038] 일반메밀과의 총 페놀 화합물 함량비교는 Folin-Denis 방법(Singleton and Rossi, 1965)에 따라 분석하였다. 각 추출물을 1 mg/ml 농도로 조제한 후, 이 시료액 1 ml에 증류수 3 ml를 첨가하고, Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 ml를 첨가한 후 27℃ shaking bath에서 혼합하였다. 5분 후 NaCO₃ 포화용액 1 ml를 넣어 혼합하여 실온에서 1시간 방치한 후 640 nm에서 분광광도계(UV. 1650PC, SHIMADZU, Kyoto, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 페놀 화합물 함량은 표준물질 galic acid의 농도를 이용하여 검량선을 작성한 후 정량하였다. 단위는 추출물 kg당 정량된 화합물을 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 표시하였다.

[0039] 총 페놀 화합물의 함량은 일반메밀의 총 페놀 화합물 함량은 $45.70 \pm 9.75 \mu\text{g}/\text{mg}$, 흑메밀의 경우는 $152.72 \pm 16.68 \mu\text{g}/\text{mg}$ 로 약 3.3배 더 높은 함유량을 나타내었다.

[0040] 실시예 3.: 총 플라보노이드 함량 비교

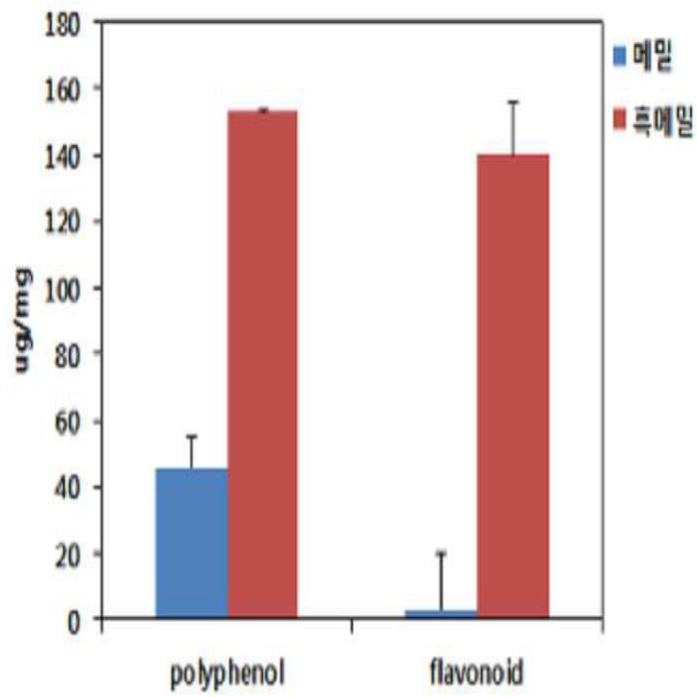
[0041] 일반메밀과의 총 플라보노이드 함량 비교는 동결건조된 각 시료 0.1 g에 Lister et al.(1994) 변법에 따라 75% 메탄올을 가하여 실온에서 하룻밤 동안 추출한 다음 이 검액 1.0 mL를 시험관에 취하고 10 mL의 diethylene glycol을 가하여 잘 혼합하였다. 다시 여기에 1 N NaOH 0.1 mL를 잘 혼합시켜 37℃ 의 water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 50% 메탄올 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 rutin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 표준 검량곡선을 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

[0042] 총 플라보노이드 함량은 일반메밀의 총 플라보노이드 함량은 $3.33 \pm 0.33 \mu\text{g}/\text{mg}$, 흑메밀의 경우는 $139.78 \pm 16.16 \mu\text{g}/\text{mg}$ 로 약 41.8배 더 높은 함유량을 나타내었다.

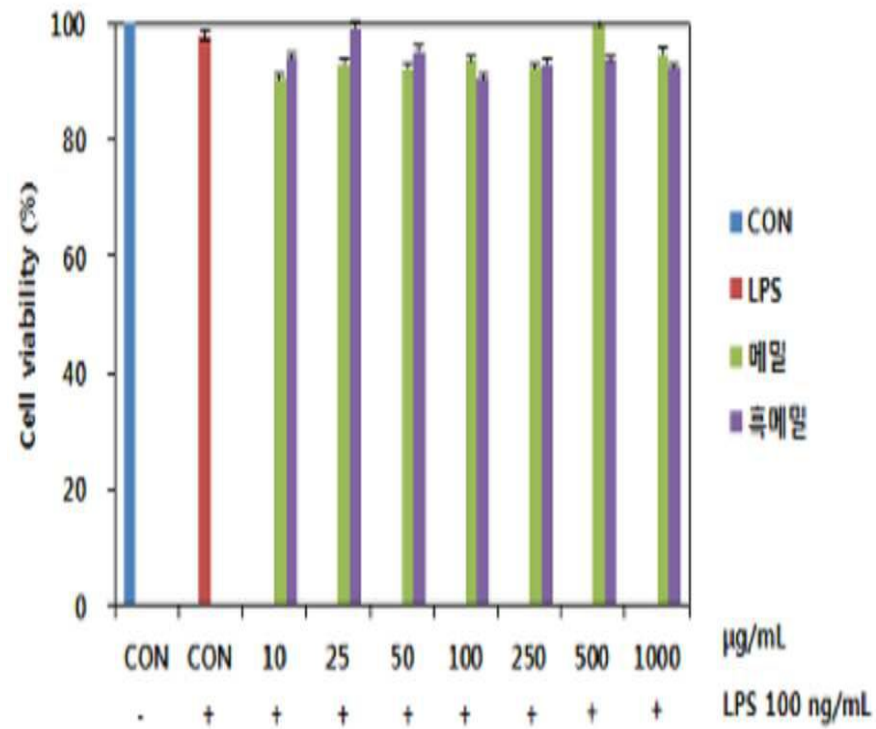
- [0043] 실시예 4: 세포생존율
- [0044] LPS로 자극된 BV-2세포에서 LPS 및 흑메밀 추출물이 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해 cell biability를 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 분석법으로 측정하였다.
- [0045] 세포(1×10^5 cell/ml)를 96-well plate에 180 μ L씩 분주하여 12시간 이상 CO2 배양기에서 배양한 다음, 시료를 각각의 조건에 따라 처리하여 24시간 배양하였다. 배양한 후 배양액을 제거하고 0.5 mg/ml MTT가 함유되어 있는 배지 200 μ L를 첨가한 다음 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 그 후 배양액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO) 100 μ L 첨가하여 생성된 formazone결정을 용해시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.
- [0046] Cell viability 측정 결과 LPS 및 흑메밀 추출물을 단독으로 또는 같이 처리한 모든 실험군에서 대조군에 비하여 세포 생존율이 변하지 않음을 확인하였다 (도 2).
- [0047] 이는 염증 유도 물질인 LPS와 흑메밀 추출물이 세포 생존에는 영향을 주지 않음을 나타낸다.
- [0048] 실시예 5: 흑메밀 추출물의 DPPH radical 소거능
- [0049] 시료인 흑메밀 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 추출물 용액 30 μ L와 메탄올에 용해한 60 μ M DPPH 용액 30 μ L를 각각 가하고, 상온에서 2분 동안 반응시켜 capillary tube에 옮긴 다음 electron spin resonance (ESR) spectrometer (JES-PX 2300, JEOL, Japan)로 측정하였다. 이 때 ESR spectrophotometer의 측정조건은 magnetic field의 경우 336.5 ± 5 mT, microwave power의 경우 5 mW, modulation frequency의 경우 9.41 GHz, modulation 향산화 시료에 대한 DPPH free radical 소거 활성 (%)은 (ESR signal intensity for medium containing the additives of concern/ESR signal intensity for the control medium) X100으로 계산하였으며, 실험결과 흑메밀 추출물의 적은 농도에서도 그리고 농도 의존적으로 DHHP radical이 제거되는 것을 확인하였다.
- [0050] 실시예 6: LPS로 활성화된 신경교세포에서 흑메밀 추출물의 농도 의존적인 NO 생성저해 작용
- [0051] 흑메밀 추출물의 항염증 효능을 분석하기 위하여 본 연구에서는 염증 유발 인자인 LPS를 각 농도별로 자극된 신경교세포에서 생산되는 NO 농도를 의존적으로 효능을 있는지 확인하였다.
- [0052] NO 측정은 24 well plate에 세포를 5×10^5 cell/을 seeding 한 후, LPS와 추출물을 농도차를 두어 첨가한 후, 24h incubator에서 반응시킨 후, 각각 50 μ L씩 Griess reagent (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H3PO4)와 반응 시킨 후, 파장이 540nm인 Sunrise basic 96-well microplate spectrophotometer (TECAN AUSTRIA)를 사용하여 값을 측정한다.
- [0053] 신경교세포에서 LPS (100ng/mL)에 의해서 유도되는 NO는 약 23 μ M로 대조군인 2 μ M에 비하여 약 11배 이상 증가하였고, 실험군으로 흑메밀 추출물을 10, 25, 50 μ g/ml 농도별로 처리를 한 결과 각각 NO 생성이 9, 6, 3 μ M로 흑메밀 추출물의 농도 의존적으로 줄어드는 것을 확인하였다(도 3).

도면

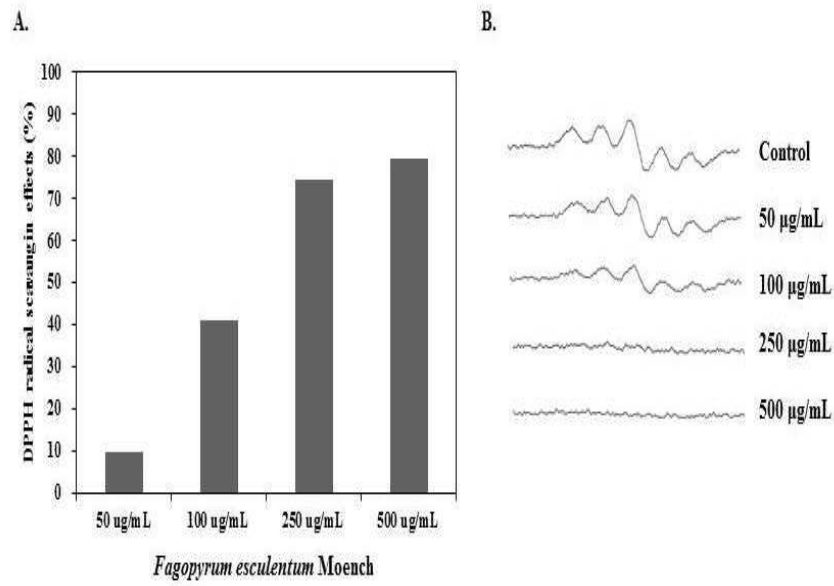
도면1



도면2



도면3



도면4

