(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0070901
(43) 공개일자 2014년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/62 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0137043
(22) 출원일자 2012년11월29일
심사청구일자 2012년11월29일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
장경자
서울 서초구 전원말4길 19, (방배동)
유정순
인천 남구 학익소로61번길 135, 34동 503호 (학익동, 신동아아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

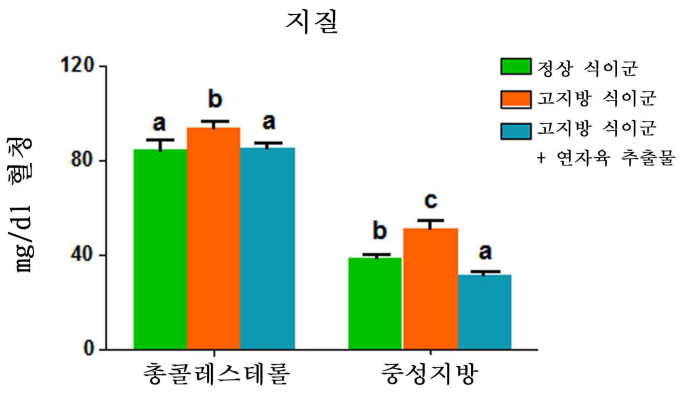
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **연자육 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 연자육(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 연자육 추출물을 분화된 인간 지방세포에 처리하고, 고지방 식이군 Sprague-Dawley 수컷 쥐에게 경구 투여했을 때, 지방세포 분화 및 관련 유전자의 발현을 억제하여 성숙한 지방세포로의 분화 및 지방 축적을 억제하고, 고지방 식이를 한 쥐에서 복부지방 저하와 혈중 지질농도 유의적으로 개선함으로써, 연자육 추출물을 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 건강 식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

김성훈

서울 서초구 전원말4길 19, (방배동)

박소윤

인천 남구 매소홀로309번길 32, 102동 3102호 (학익동, 엑슬루타워)

이윤주

경기 수원시 권선구 매실로 70, 104동 302호 (호매실동, 호매실GS아파트)

김소영

경기 고양시 덕양구 화신로 76, 111동 1401호 (행신동, 샘터마을1단지아파트)

자오슈

인천광역시 남구 용현동 성광교회

김경수

서울 송파구 양재대로 1218, 110동 902호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	44461-1
부처명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	학술연구용역사업
연구과제명	한식의 세계화를 위한 연의 건강기능성 및 연 이용 맞춤형 건강한 체중조절 프로그램 홍보 컨텐츠 개발
기 여 율	1/1
주관기관	준정부기관
연구기간	2011.12.30 ~ 2012.12.29

특허청구의 범위

청구항 1

연자육(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 연자육 추출물은 C_1 내지 C_2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 지방간, 고지혈증 및 동맥경화증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

연자육 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 연자육 추출물은 C_1 내지 C_2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 7

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 지방간, 고지혈증 및 동맥경화증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 연자육(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물의 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대사장애는 일반적으로 심혈관 질병을 결정짓는 위험 요소로, 비만, 당뇨병, 인슐린 저항증(insulin resistance), 지질 대사 이상, 고중성지방혈증 (hypertriglyceridemia), 유리지방산의 증가, 고밀도 콜레스테롤의 감소 및 고혈압 등의 병들이 대사성 질환에 포함된다. 대사장애는 유전적인 결함으로 인해서 신체의 대사과정에 문제가 생성되어 발생된다. 대부분 대사장애의 유전적 결함은 부모로부터 유전되며, 대사장애의 원인이 되는 유전자의 종류는 다양하다고 밝혀졌다. 대사과정은 신체에서 섭취한 음식물을 사용할 수 있는 에너지로 전환하는 일련의 과정을 일컫는다. 신체는 효소를 이용하여 음식물을 잘게 분해한 후 소화시킬 수 있는 간단한 형태로 만든다. 또한 세포 내의 또 다른 효소는 음식물로부터 섭취할 수 없는 형태의 물질을 에너지원으로 사용하기 위하여 생성하는 역할을 한다. 즉, 대사장애의 유전적인 결함은 대사에 필요한 효소가 정상적으로 활동할 수 없거나, 신체가 생성하는 효소의 양이 극도로 감소하거나, 없어지는 경우에 발생한다. 또한 유전적 결함으로 인해 섭취된 물질이 분해되지 않고, 신체 내에서 독성을 갖게 되는 경우도 발생하며, 신체에서 필요한 물질을 대사과정을 통해서 공급할 수 없는 결과가 초래되기도 한다.

[0003] 현대 사회에서 비만은 다양한 원인에 의해 체내의 지방 축적량이 증가하여 발생하고 있으며, 체내의 과도한 지방 축적의 위험에 대해서는 그리스 시대부터 알려졌다고 하나, 이로 유도되는 병에 대해서는 지난 세기 비만이 영양부족을 제치고 주요한 문제로 자리매김하면서 그 중요성이 평가되기 시작하였다. 또한, 비만은 고혈압, 당뇨병, 심장질환, 동맥경화, 고지혈증과 같은 대사성 질환으로 발전할 수 있기 때문에 그 치료와 예방이 중요하다. 또한 근래에는 비만, 당뇨병, 고지혈증 등의 증가로 비 알코올성 지방 간염이 증가하고 있으며, 일부는 간경변증으로 진행되는 것으로 알려져 있다. 더욱이 지방간이 단순한 간 질환이 아니라 대사 질환의 초기 증상으로 여겨지면서 비만으로 인한 지방간의 조기 진단과 치료의 중요성이 커지고 있다.

[0004] 연(*Nelumbo nucifera*)은 연못이나 논에서 재배되는 식물로 연근, 연잎, 연꽃, 연자육 등은 식용 및 약용으로 널리 쓰여지고 있다. 연은 다양한 생리활성물질을 함유하고 있는데 캠프페롤(kaempferol), 쿼세틴(quercetin), 이소쿼세틴(isoquercetin)과 같은 플라보노이드(flavonoids)와 폴리페놀(polyphenol) 화합물 등이 다량 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 연은 항산화 효과를 포함한 다양한 효능이 보고되어 있으므로 식품가공재료 및 생물자원으로서 개발 잠재력이 무한하나 대부분 분말, 차, 막걸리, 국수류 등 단순 가공품으로 유통되고 있어 품질의 고급화, 다양화 및 편의성을 추구하는 현대 소비자들의 욕구를 충족시키지 못하고 있는 실정이다. 연의 잎, 뿌리, 줄기, 꽃, 열매, 어린 눈 및 어린 뿌리에 이르기까지 다양한 부위가 약재로서 이용되어 왔다. 잎은 갈아서 설사를 치료하는데 사용하고, 감초와 함께 달여서 일사병을 치료하는데 사용하였다. 꽃잎은 달여서 조루증을 치료하고, 꽃 턱받침은 달여서 복부의 경련이나 하혈을 치료하는데 사용하였다. 또한, 연꽃 줄기는 위궤양이나 생리 혹은 산후 출혈이 심한 경우에 지혈을 위해서 사용되었다. 꽃의 수술은 빈뇨, 조루, 체내에서 적혈구가 붕괴하여 헤모글로빈(hemoglobin)이 혈구(血球) 밖으로 용출되는 용혈증상 혹은 여성의 하혈에 사용되었다. 열매는 달여서 불안, 열, 심장 통증에, 씨앗에는 알칼로이드(alkaloids)와 플라보노이드(flavonoids)가 함유되어 있으므로, 혈압강하, 혈관 확장 및 진정제로 사용되었다. 연의 씨앗은 콜레스테롤 수치를 낮추며, 자궁의 평활근을 이완시키며 소화장애, 장염, 만성설사, 정액루(spermatorrhoea, 精液漏), 불면증, 심박수 이상 등에 사용되었다.

[0005] 연자육(*Nelumbo nucifera* seed)은 연꽃의 성숙한 열매 껍데기를 제거한 종자로서, 냄새는 없고 맛을 달고 약간 떫다. 연자육은 다량의 전분과 라피노스(raffinose)라는 당을 함유하고 있으며, 약리작용으로는 비장과 위장의 기능강화, 수면불안, 피부미백, 염증완화작용, 피부 상처치유 등의 효과가 알려져 있으나, 지금까지 대사성 질환에 대한 효과는 잘 알려져 있지 않다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 연자육 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 분화된 인간 지방세포에 처리하고, 고지방 식이군 Sprague-Dawley 수컷 쥐에게 경구 투여하여 연자육 추출물의 기능을 규명한 결과, 본 발명의 연자육 추출물은 지방세포 분화 및 관련 유전자의 발현을 억제하여 성숙한 지방세포로의 분화 및 지방 축적을 억제하고, 고지방식이를 한 쥐에서 복부지방 저하와 혈중 지질농도 개선 효과를 보이므로 대사성 질환을 위한

예방 및 치료용 약학적 조성물 및 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 연자육(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물, 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 연자육(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 연자육(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 연자육(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물은 지방세포 분화 및 관련 유전자의 발현을 억제하여 성숙한 지방세포로의 분화 및 지방 축적을 억제하고, 고지방식이를 한 쥐에서 복부지방 저하와 혈중 지질농도를 유의적으로 개선하므로, 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 건강 식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 분화된 인간 지방세포에서 지질 축적에 있어서 연자육 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

도 2는 인간 지방세포에서 PPAR-γ, 렙틴(leptin) 및 GLUT4의 발현에 있어서 연자육 추출물의 효과를 나타낸 도이다.

도 3은 고지방 식이군 쥐에 연자육 추출물을 먹인 후, 쥐의 지방조직 변화를 나타낸 도이다.

a, b, c: 일원분산분석 후, Duncan's multiple range test로 사후 검증시 유의수준 $p<0.05$에서 차이가 있음을 의미함.

도 4는 고지방 식이군 쥐에 연자육 추출물을 먹인 후, 쥐의 혈중 지질 변화를 나타낸 도이다.

a, b, c: 일원분산분석 후, Duncan's multiple range test로 사후 검증시 유의수준 $p<0.05$에서 차이가 있음을 의미함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명은 연자육(*Nelumbo nucifera* seed) 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 유효성분인 연자육 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

[0015] 1) 연자육에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0016] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

[0017] 3) 단계 2)의 여과물을 감압 농축하는 단계; 및

[0018] 4) 단계 3)의 농축물을 건조하는 단계.

[0019] 본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 1)의 연자육은 재배한 것 또는 시판되는 것을 제한없이 사용할 수 있다.

[0020] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C_1 내지 C_2의 저급 알코올 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhelt 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 연자육 분량의 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 2 내지 3배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출 온도는 20℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며, 20℃ 내지 50℃인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한 추출시간은 1 내지 48시간이 바람직하며, 2 내지 10시간이 더욱 바람직하고, 2 내지 5시간이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0022] 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 지방간, 고지혈증 및 동맥경화증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0023] 본 발명의 연자육 추출물의 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물로서의 효능을 확인하기 위하여, 연자육의 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출물을 수득하였다(실시예 1 참조).

[0024] 또한, 본 발명의 연자육 추출물의 대사성 질환의 하나인 복부 비만의 예방 및 치료에의 효과를 알아보기 위하여, 본 발명의 연자육 추출물을 분화된 인간 지방세포에 처리하였을 때, 지방세포 분화시 지방생성을 억제하는 것을 확인하였다(도 1 참조). 일반적으로 지방전구세포에서 성숙지방세포로의 분화는 복잡한 단계를 거치게 되며 관련된 여러 조절인자들의 발현 촉진과정을 거치게 된다. 이러한 분화과정에서 중추적인 역할을 하는 것 중의 하나가 유전자 전사조절인자인 퍼옥시좀 증식인자 활성수용체-감마(PPAR-γ)이다. PPAR-γ는 지방세포의 성숙분화를 담당하는 유전자의 발현을 제어하고 있으며, 글루코스 수송체 4(GLUT4)와 렙틴(leptin)은 지방세포분화의 최종단계의 마커로서 알려져 있다. 본 발명의 연자육 추출물 처리시 PPAR-γ와 같은 지방세포 형성에 관여하는 전사인자와 GLUT4, leptin과 같은 지방세포 마커 유전자의 발현을 억제하는 효과를 확인하였다(도 2 참조).

[0025] 또한, 본 발명의 연자육 추출물을 고지방 식이군 Sprague-Dawley 수컷 쥐에게 경구 투여하고 지방 조직 무게를 측정한 결과, 부고환지방량은 고지방 식이군이 정상식이군에 비해 유의적으로 많았으나 연자육군은 고지방 식이군에 비해 유의적으로 낮았고, 후복막지방량은 고지방 식이군과 연자육군이 정상 식이군에 비해 유의적으로 많은 것을 확인하였다(도 3 참조).

[0026] 아울러, 본 발명의 연자육 추출물을 고지방 식이군 Sprague-Dawley 수컷 쥐에게 경구 투여하고 혈중 지질 농노를 측정한 결과, 고지방 식이군의 총콜레스테롤 함량은 정상 식이군보다 유의적으로 높았으나 연자육군은 고지방 식이군에 비해 유의적으로 낮았고, 고지방 식이군의 중성지방 함량은 정상 식이군보다 유의적으로 높았으나 연자육군에서는 정상 식이군과 고지방 식이군보다 유의적으로 낮은 것을 확인하였다(도 4 참조).

[0027] 따라서, 본 발명의 연자육 추출물은 지방세포 분화 및 관련 유전자의 발현을 억제하여 성숙한 지방세포로의 분화 및 지방 축적을 억제하고, 고지방 식이를 한 쥐에서 복부지방 저하와 혈중 지질농도 개선 효과를 보이므로, 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0028] 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여(예를 들어, 도포 또는 정맥 내, 피하, 복강 내 주사)할 수 있으나 경구 투여가 바람직하다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파

스타제 또는 카타플 라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 국소 투여의 조성물은 임상적 처방에 따라 무수형 또는 수성형일 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캅셀제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0029] 상기 조성물은 투여를 위해서 연자육 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 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 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형 등으로 제제화할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1~90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.

[0031] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 환자의 연령, 성별 및 비만의 정도에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1kg당 본 발명의 조성물을 1일 0.0001 내지 100 ㎎/㎏으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 ㎎/㎏으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 대사성 질환 치료용 조성물은 연자육 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0033]

[0034] 아울러, 본 발명은 연자육 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0035] 본 발명의 유효성분인 연자육 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

[0036] 1) 연자육에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0037] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

[0038] 3) 단계 2)의 여과물을 감압 농축하는 단계; 및

[0039] 4) 단계 3)의 농축물을 건조하는 단계.

[0040] 본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 1)의 연자육은 재배한 것 또는 시판되는 것을 제한없이 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C_1 내지 C_2의 저급 알코올 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhelt 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 연자육 분량의 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 2 내지 3배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출 온도는 20℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며, 20℃ 내지 50℃인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한 추출시간은 1 내지 48시간이 바람직하며, 2 내지 10시간이 더욱 바람직하고, 2 내지 5시간이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 제조방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0043] 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 지방간, 고지혈증 및 동맥경화증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0044] 본 발명의 연자육 추출물을 고지방식이와 함께 쥐에게 먹였을 때, 체중의 감소, 복부 지방 감소 효과를 보이며, 혈중의 지질 감소효과를 보이므로, 연자육 추출물을 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품으로 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 연자육 추출물은 식품학적으로 허용된 담체와 혼합하여 식품 조성물로서 제공될 수 있다.

[0046] 본 발명의 연자육 추출물을 식품 또는 음료 첨가물로 사용할 경우, 상기 연자육 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 연자육 추출물의 혼합양은 그의 사용목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우, 상기 연자육 추출물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에, 장기간 복용이 가능하다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿류, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 연자육 추출물 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이제 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올이다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖ 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제[타우마린, 스테비아 추출물(예, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(예, 사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0047] 다른 양태로서, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한 본 발명의 식품 조성물은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0048] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

[0049] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0050] **<실시예 1> 연자육 추출물의 제조**

[0051] 건조한 연자육(경기도 시흥시에서 구입) 1.4 kg을 잘게 파쇄한 후, 2.0 g/100 ㎖의 비율로 70% 에탄올 7ℓ로 50℃의 중탕에서 2시간 동안 추출한 후, 추출물을 감압여과시킨 후, 회전식 증발기(rotary vacuum evaporator)를 이용하여 수분을 제거한 후, 건조 과정을 거쳐 6.83%의 수율로 총 96.4657g을 수득하였다. 하기 <실험예 2>에 사용할 때에는 건조한 시료를 400 ㎎/kg 체중으로 식염수에 섞어 경구투여한다.

[0052] **<실험예 1> 연자육 추출물의 지방세포에서의 분화 및 지방 축적 억제효과 확인**

[0053] **<1-1> 지방 분화 억제효과 확인**

[0054] 연자육 추출물의 지방세포에서의 분화에 대한 효과를 확인하기 위하여, 인간 지방전구세포(Human preadipocyte)를 지방세포(adipocyte)로 분화유도하면서 연자육 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 지방세포 분화 억제 효과를 비교하였다.

[0055] 인간(Human) 지방전구세포(Cell Applications Inc., 미국) 지방전구세포 배양 배지 키트(preadipocyte growth medium Kit)(Cell Applications Inc., 미국)를 이용하여 6-웰 플레이트(6-well plates)에 1.8×10^{5} cell/well

의 세포를 2 ㎖씩 분주하여 컨플루엔트(confluent) 상태가 될 때까지 37℃, 5%로 이산화탄소가 공급되는 세포배양기에서 배양하였다. 상기 지방전구 세포를 지방세포 분화를 위해 배양했던 배지를 지방세포 분화 배지(adipocyte differentiation medium)(Cell Applications Inc., 미국)로 바꾸어 2주 동안 배양하였다. 그리고, 상기 지방세포로 분화유도하면서 본 발명의 연자육 에탄올 추출물을 0, 25, 50, 100 ㎍/㎖의 농도별로 처리하여 지방세포 분화 억제 효과를 확인하였다. 또한, 분화가 완료된 지방세포에서 Oil red O 염색을 통해 지방 축적의 여부를 확인하였다. 상기 분화가 완료된 지방세포를 10% 포름알데히드(formaldehyde) 인산완충염 용액으로 1시간 동안 고정시킨 후, 상기 세포를 인산완충염 용액(PBS)로 세척하였다. 상기 고정된 세포를 Oil Red O(Sigma 사, 미국)가 있는 60% 이소프로판올(isopropanol) 용액으로 2시간동안 염색하였다. 상기 염색된 세포는 세포질내 붉은색 과립이 있는 세포를 분화된 지방세포로 간주하고, 광학현미경을 이용하여 관찰하였고 사진 촬영하였다. 또한, 상기 세포에 염색된 Oil Red O를 이소프로판올 용액으로 녹여내어 흡광기를 사용해서 510 ㎚의 분석 조건에서 흡광도 측정하였다.

[0056] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 연자육 에탄올 추출물을 첨가한 실험군에서 농도 의존적으로 지방구가 감소되는 것을 확인하였다(도 1A). 지질 축적을 정량적으로 조사하기 위하여 지방구를 염색한 Oil red O 염색 성분을 용해시킨 후 흡광도를 측정한 결과도 유의적으로 농도의존적으로 흡광도가 감소하여 지질축적이 감소가 되었음을 확인하였다(도 1B).

[0057]

[0058] **<1-2> 지방 형성 관련 유전자 발현 억제효과 확인**

[0059] 연자육 추출물의 지방 형성 관련 유전자 발현 억제효과 확인하기 위하여, 상기 실시예 <1-1>의 연자육 추출물을 농도별로 처리한 분화된 지방세포에서 RT-PCR방법 (TAKARA cDNA 합성 키트)을 사용해서 지방 형성 관련 유전자 발현정도를 비교하였다. 이를 위해 먼저, 상기 연자육 추출물을 농도별로 처리한 분화된 지방세포를 Trizol(Invitrogene, 미국)시약을 이용해 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA를 분리한 후, 랜덤 프라이머(random 9 mers)를 사용해서 첫 번째 가닥 cDNA를 역전사했고 (95℃에서 5분, 42℃에서 60분, 72℃에서 10분) 상기 cDNA는 유전자 특이적 프라이머를 사용해서 PCR (ppar-γ 유전자;95℃에서 45초, 55℃에서 45초 및 72℃에서 45초(28 cycles), leptin 유전자;95℃에서 45초, 59℃에서 45초 및 72℃에서 45초(35 cycle), GLUT4 유전자;95℃에서 45초, 62℃에서 45초 및 72℃에서 45초(35 cycle))로 PPAR-γ, Leptin, GLUT4 유전자를 증폭했다. 상기 증폭된 1의 cDNA를 하기 표 1에 기재된 서열번호 1 내지 8의 프라이머(primers)를 이용하여 PCR 반응시킨 후 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)에 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 UV에서 확인하였다.

[0060] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 연자육 추출물 처리시 지방 형성에 관련하는 퍼옥시좀 증시인자-활성화 수용체-감마(PPAR-γ), 렙틴(leptin), 글루코스 수송체 4(GLUT4) 유전자가 모두 100 ㎍/㎖ 농도의 연자육 추출물 처리에서 유전자 mRNA의 발현이 억제됨을 확인하였다(도 2).

표 1

본 발명의 프라이머

유전자	정방향	역방향
PPAR-γ	TCGGTTTCAGAAATGCCTTG (서열번호 1)	AGGTCAGCGGACTCTGGATT (서열번호 2)
Leptin	CGCAGTCAGTCTCCTCCAAA (서열번호 3)	GGTTCTCCAGGTCGTTGGAT (서열번호 4)
GLUT4	TGGCTGAGCTGAAGGATGAG (서열번호 5)	CCAACAACACCGAGACCAAG (서열번호 6)
β-actin	TCATGAGGTAGTCAGTCAGG (서열번호 7)	CTTCTACAATGAGCTGCGTG (서열번호 8)

[0061]

[0062] **<실험예 2> 연자육 추출물의 생체 내에서의 효과 확인**

[0063] 본 발명의 연자육 추출물의 생체 내에서의 효과를 확인하기 위하여, Sprague-Dawley 수컷 쥐(4 주령)를 구입(코아텍, 한국)하여 1주일간 적응시킨 후 정상 식이군(10마리), 고지방 식이군 군(20마리)으로 나누어 7주간 사육

후, 고지방 식이군은 다시 무작위로 고지방 식이군(10마리)과 연자육군(10마리)으로 나누어 7주간 사육하였다. 상기 연자육군은 연자육 에탄올 추출물을 각 체중 당 400 ㎎/㎏의 수준으로 7주간 매일 경구 투여를 하였다. 본 발명에서 사용한 실험 식이의 기본조성은, 하기 표 2에 기재된 바와 같이, AIN-93에 기준하여 조제하였다(표 2).

표 2

본 발명의 사용된 식이의 구성

유효성분	성장 식이 (100g)	고지방 식이 (83.75 g)
Casein	20	20
Corn starch	39.75	10.5
Sucrose	10	10
Dextrinized cornstarch	13.2	13.2
Soy Bean oil	7	2.5
Lard	0	17.5
Cellulose	5	5
Vitamin mixture	1	1
Mineral mixture	3.5	3.5
L-cystine	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25

[0064]

[0065] **<실험예 3> 연자육 추출물의 지방 축적 억제효과 확인**

[0066] 연자육 추출물의 지방 축적 억제효과를 확인하기 위하여, 상기 <실시예 2>의 실험동물을 부검하여 복부 지방을 적출하여 무게를 비교하였다. 실험동물의 혈액은 실험기간 종료 전 12시간 절식시킨 후 에테르(ether)로 마취시켜 심장으로부터 채혈하였다. 채혈한 혈액은 원심분리관에 담아 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 분리된 혈청은 영하 70℃에서 분석시까지 냉동보관하였다. 상기의 방법에 따라 혈액을 채취한 후 즉시 부고환지방(epididymal fat)과 후복막지방(retroperitoneal fat)을 분리하여 무게 측정하였다.

[0067] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 부고환지방량은 고지방 식이군이 정상식이군에 비해 유의적으로 많았으나 연자육군은 고지방식이군에 비해 유의적으로 낮았고, 후복막지방량은 고지방 식이군과 연자육군이 정상식이군에 비해 유의적으로 많은 것을 확인하였다(도 3).

[0068] **<실험예 4> 연자육 추출물의 혈중 지질 농도 개선효과 확인**

[0069] 연자육 추출물의 지질 농도 개선효과를 확인하기 위하여, 상기 <실험예 3>의 방법에 따라 분리된 혈청의 지질 농도를 측정하여 확인하였다. 상기 혈청 지질의 농도는 중성지방, 총 콜레스테롤 농도를 자동분석기(Kuadro, 이탈리아)를 이용해 측정하였다.

[0070] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 고지방식이군의 총 콜레스테롤 함량은 정상식이군보다 유의적으로 높았으나 연자육군은 고지방식이군에 비해 유의적으로 낮았고, 고지방식이군의 중성지방 함량은 정상식이군보다 유의적으로 높았으나 연자육군에서는 정상식이군과 고지방식이군보다 유의적으로 낮은 것을 확인하였다(도 4).

[0071] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0072] **<1-1> 산제의 제조**

[0073] 본 발명의 연자육 추출물 2 g

[0074] 유당 1 g

[0075] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0076] **<1-2> 정제의 제조**

[0077] 본 발명의 연자육 추출물 100 mg

[0078] 옥수수전분 100 mg

[0079] 유 당 100 mg

[0080] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0081] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0082] **<1-3> 캡슐제의 제조**

[0083] 본 발명의 연자육 추출물 100 mg

[0084] 옥수수전분 100 mg

[0085] 유 당 100 mg

[0086] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0087] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0088] **<1-4> 환의 제조**

[0089] 본 발명의 연자육 추출물 1 g

[0090] 유당 1.5 g

[0091] 글리세린 1 g

[0092] 자일리톨 0.5 g

[0093] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0094] **<1-5> 과립의 제조**

[0095] 본 발명의 연자육 추출물 150 mg

[0096] 대두 추출물 50 mg

[0097] 포도당 200 mg

[0098] 전분 600 mg

[0099] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0100] **<제조예 2> 식품의 제조**

[0101] **<2-1> 과자 및 분식의 제조**

[0102] 본 발명의 연자육 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0103] **<2-2> 유제품의 제조**

[0104] 본 발명의 연자육 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0105] **<2-3> 선식의 제조**

[0106] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0107] 본 발명의 연자육 추출물을 진공 농축기에서 감압 농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다. 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 연자육 추출물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0108] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0109] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0110] 본 발명의 연자육 추출물의 건조분말(3 중량부),

[0111] 영지(0.5 중량부), 및 지황(0.5 중량부)

[0112] **<제조예 3> 음료의 제조**

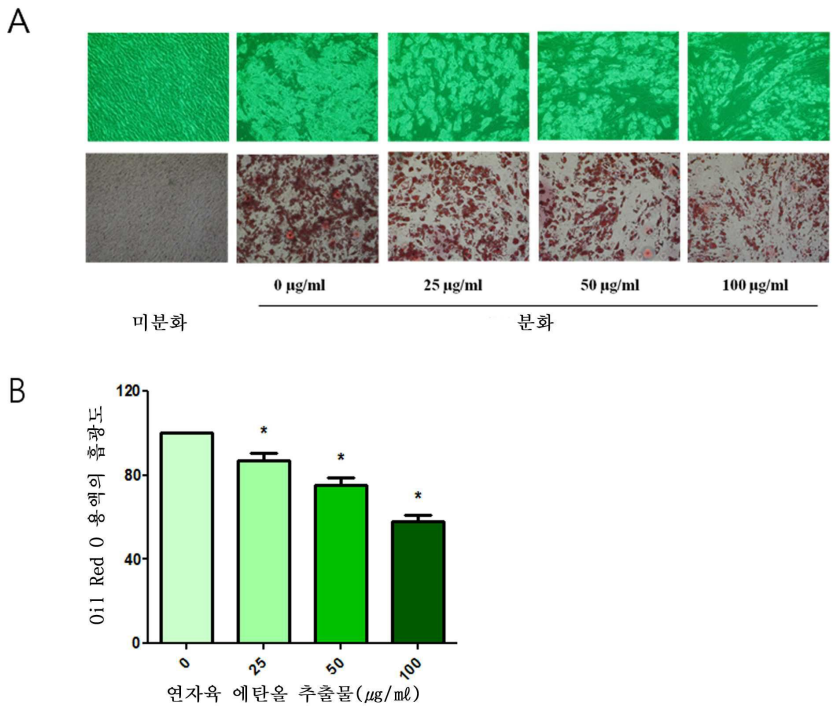
[0113]	본 발명의 연자육 추출물	1000 ㎎
[0114]	구연산	1000 ㎎
[0115]	올리고당	100 g
[0116]	매실농축액	2 g
[0117]	타우린	1 g
[0118]	정제수를 가하여 전체	900 ㎖

[0119] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강식품 제조에 사용한다.

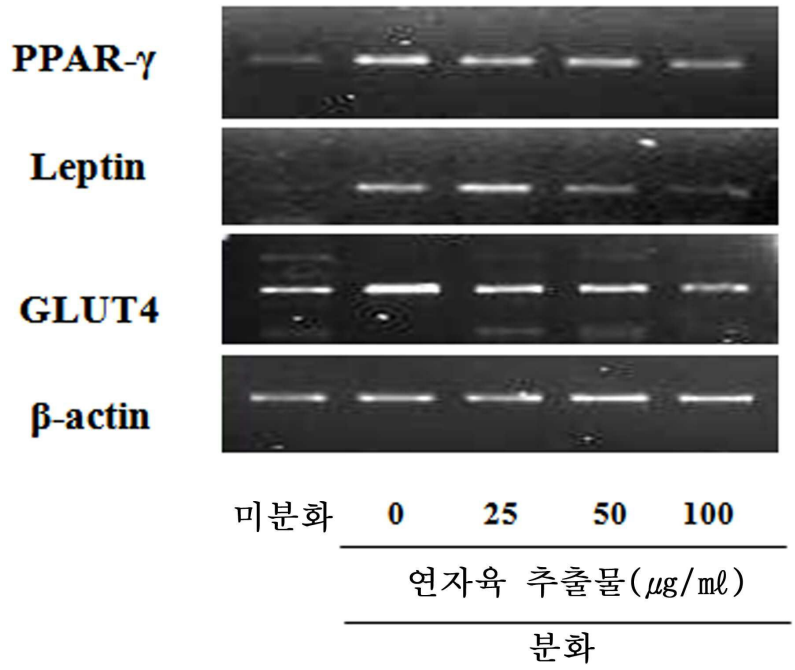
[0120] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

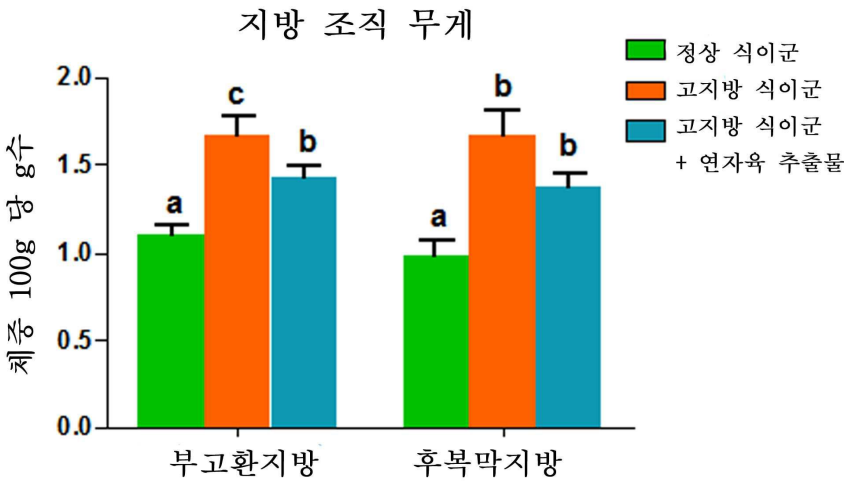
도면1


A
0 μg/ml
25 μg/ml
50 μg/ml
100 μg/ml
미분화
분화
B
Oil Red O 용액의 흡광도
120
80
40
0
*
*
*
0
25
50
100
연자육 에탄올 추출물(μg/㎖)

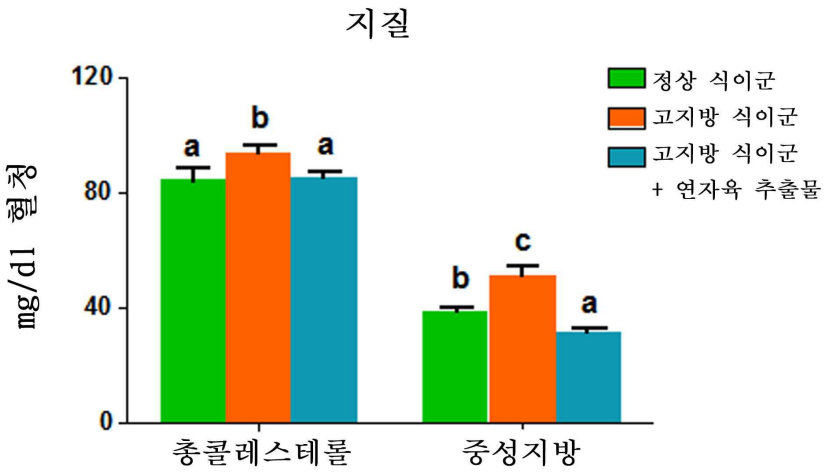
도면2


PPAR-γ
Leptin
GLUT4
β-actin
미분화
0
25
50
100
연자육 추출물(μg/㎖)
분화

도면3


지방 조직 무게
체중 100g 당 g수
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
c
b
a
b
b
부고환지방
후복막지방
정상 식이군
고지방 식이군
고지방 식이군
+ 연자육 추출물

도면4


지질
mg/dl 혈청
120
80
40
0
a
b
a
b
c
a
총콜레스테롤
중성지방
정상 식이군
고지방 식이군
고지방 식이군
+ 연자육 추출물