(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년10월19일
(11) 등록번호 10-1786463
(24) 등록일자 2017년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/54 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0099829
(22) 출원일자 2014년08월04일
심사청구일자 2014년08월04일
(65) 공개번호 10-2016-0017758
(43) 공개일자 2016년02월17일
(56) 선행기술조사문헌
LEE, YUNMI et al., 'Inhibitory Activities of Pancreatic Lipase and Phosphodiesterase from Korean Medicinal Plant Extracts', Phytotherapy Research. Vol.26, 2012, pp778-782*
KR1020080020738 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)휴림
서울특별시 강남구 논현로 555, 한진빌딩 4층 (역삼동)
(72) 발명자
조주현
충청북도 충주시 신촌2길 29 104동 908호 (호암동,현대아파트)
박인재
충청남도 천안시 동남구 봉명동 천안여상로 45-3
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤희식

전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 신창훈

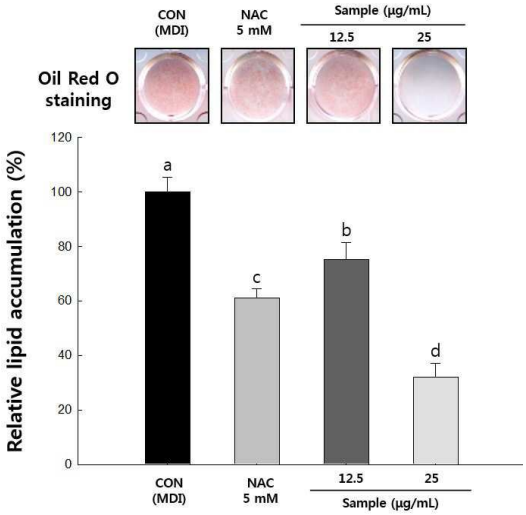
(54) 발명의 명칭 **까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 까마귀쪽나무를 이용한 대사증후군 개선 효능을 갖는 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 까마귀쪽나무 열매로부터 획득되는 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하여 대사증후군 개선 효능을 가지는 이루어진 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

이러한 본 발명인 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물은, 까마귀쪽나무의 종자(씨앗)를 제거한 열매로부터 획득되며 열매 정유성분(Oil)를 포함하며, 보통 주정추출법, 헥산추출법, 초임계추출법, 증류법, 압착법 중 어느 하나의 방법으로 획득되게 된다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최구희

충청북도 청주시 청원구 외남로59번길 19-1 (외남동)

박성환

제주특별자치도 제주시 아봉로 279-19 나동 301호 (월평동,대웅별장)

이옥환

강원도 춘천시 지석로 29 503동 202호 (석사동,퇴계주공5단지아파트)

김단비

강원도 원주시 홍양로 51번길10 205동 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R0001968
부처명	산업통상자원부(구, 지식경제부)
연구관리전문기관	한국산업기술진흥원(KIAT)
연구사업명	2012 제주광역경제권 선도산업육성사업
연구과제명	제주생물자원을 활용한 혼합음료개발 및 상품화
기 여 율	1/1
주관기관	주식회사 휴럼중앙연구소
연구기간	2012.06.01 ~ 2015.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

종자를 제거한 까마귀쪽나무 열매에 용매인 노말헥산(n-hexane)을 중량대비 9-11 배수로 투입하고, 상온에서 24 시간 동안 교반시켜 추출하고, 헥산(n-hexane) 층을 제거하여 획득되는 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물.

청구항 2

종자를 제거한 까마귀쪽나무 열매에 용매인 노말헥산(n-hexane)을 중량대비 9-11 배수로 투입하고, 상온에서 24 시간 동안 교반시켜 추출하고, 헥산(n-hexane) 층을 제거하여 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 까마귀쪽나무를 이용한 대사증후군 개선 효능을 갖는 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 까마귀쪽나무 열매로부터 획득되는 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하여 대사증후군 개선 효능을 가지는 이루어진 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대사증후군(Metabolic syndrome)은 비만, 고혈압, 당뇨병 (당대사 이상 포함), 이상 지혈증(중성지방 상승, 고밀도 콜레스테롤 감소), 고혈압 등의 여러 질환이 복합적으로 나타나는 질환으로 정의되어진다. 2011년을 기준으로 국민의 1/4이상이 대사증후군 증상을 갖고 있는 것으로 보고되고 있으며 성인에서 소아에 이르기까지 전 연령층에서 대사증후군의 발병 요인이 증가하고 있는 추세이다.

[0003] 복합적 증상으로 나타나는 대사증후군의 원인에 대하여 논란이 있어 왔지만, 현재 연구자들에게 가장 중요한 요

소로 복부 비만 및 인슐린 저항성으로 받아들여지고 있다.

[0004] 따라서, 대사성증후군의 발병과 깊은 상관관계를 보여주는 비만과 이로 인한 인슐린저항성의 주요원인을 밝혀내고, 이들 주요원인을 조절하여 대사증후군을 예방할 수 있는 기능성소재의 개발이 요구되어지고 있다.

[0005] 최근 여러 연구에서 비만과 인슐린저항성이 reactive oxygen species (ROS)에 의에 유발된다는 것이 밝혀졌고, 이런 산화적 스트레스가 당뇨병에서 혈관 합병증의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다.

[0006] 특히, 산화적 스트레스는 지방축적과 유의적인 상관관계를 보이며, 일정 농도로 H_2O_2를 처리한 지방세포에서는 대조군에 비해 지방의 축적량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타냈으며, 반면에 기능성성분이 함유된 bioactive compounds는 세포내 산화적 스트레스를 억제하고 지방의 축적도 유의적으로 감소시키는 경향을 나타내는 결과도 보고되었으며, 대사증후군 개선과 연관된 ROS의 저감화에 대한 작용기전을 제시한 연구도 보고되어졌다(Lee et al., 2011, J Phycol, 47: 548-556, Lee et al. 2011, Phytother Res 등).

[0007] 또한, 까마귀쪽나무(Litsea japonica)는 상록엽소 교목으로서 수직적으로 표고 700m 이내의 바닷가 및 산기슭에 주로 분포한다.

[0008] 이 식물의 화학적 구성에 대한 기존의 연구에서, 여러 종류의 essential oils, fatty acids, lactones, alkaloids 및 terpenoids가 발견되었다고 보고되어있다.

[0009] Lactones의 종류로 알려진 hamabiwalactone A, hamabiwalatone B, akolactone B, litsealactone A 및 litsealactoneB가 분리되었다.

[0010] 또한, 잎으로부터 분리된 flavonoids 성분인 epicatechin, afzelin, quercitrin 및 tiliroside의 anti-complement activity를 조사한 결과 및 tiliroside가 complement system에 대해 가장 강력한 억제작용을 나타냄이 보고되어있다.

[0011] 까마귀쪽나무 잎 80% EtOH 추출물을 분획 후, 분획물을 사용하여 항산화(DPPH, Xanthine Oxidase, Superoxide radical -> 분획물 EtOAC 층에서 DPPH와 Superoxid radical 억제활성이 우수함) 및 LDH, NO, PGE_2(함염)을 측정(윤원종 외, 2010, J, Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53(1): p 27~32)하였으며, 실리카 컬럼을 이용하여 잎의 플라보노이드종 분리 (Epicatechin, Afzlin, Quercitrin, Tiliroside, Myricitrin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin) 후 Anti-complement system 활성 측정(Sun Young Lee 외, 2005, PHYTOTHERAPY RESEARCH, 19 : p. 273-276)하였고, 식용 및 약용식물 중 까마귀쪽나무 잎을 메탄올을 이용하여 추출 후 과산화지질 생성억제 측정(박종철 외, 1997, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26(6) : p. 1159-1163)하는 연구에서 까마귀쪽나무의 경우 활성도는 10^{-1} mg/mL 농도에서 약 18%의 억제효과를 보인 것으로 보고하였다.

[0012] 또한, 까마귀쪽나무(Litsea japonica)의 HL-60 백혈병 세포 Apoptosis 유도효과에 대한 연구(2009, 김엘비라 외, Ykhak Hoeji, 53(1) : p. 6-11)에서 까마귀쪽나무 잎을 이용하여 80% 에탄올을 이용하여 추출하고, HL-60(세포독성)-MTT 측정결과 정상세포에는 독성을 갖지 않으며, HL-60(백혈병세포) 세포증식억제효과를 보임, DNA fragmentation 분석, Western blot 분석을 통하여 Bcl-2의 발현 감소 및 caspase를 활성화함으로서 apoptosis를 유도하여 증식을 저해효과를 보고하는 등 까마귀쪽나무에 대한 연구가 일부 이루어졌다.

[0013] 특허문헌의 종래기술로는 (KR) 공개특허 10-2009-0091477(공개일 2009.08.28)호의 까마귀쪽나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 기술과, (KR) 등록특허 10-1243243(등록일 2012.03.07)호의 까마귀쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨합병증 예방 및 치료용 조성물에 관한 기술이 제공되어 있다.

[0014] 이에 본 발명에서는 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 이용하여 비만개선효과와 ROS 저감효과 등을 확인하여 대사증후군 개선 효능을 갖는 소재를 개발하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) (KR) 공개특허 10-2009-0091477(공개일 2009.08.28)

(특허문헌 0002) (KR) 등록특허 10-1243243(등록일 2012.03.07)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 함유하는 대사증후군 개선 효능을 갖는 조성물 및 이의 제조방법을 제공함으로써, 사회적으로 대두되고 있는 비만 등 대사증후군으로 인하여 발생하는 각종 문제를 해결할 수 있도록 하고자 하는데 목적이 있다.

[0017] 즉, 본 출원인은 대사증후군 개선 효능을 갖는 소재를 개발하기 위하여 천연물로부터 스크리닝하던 중, 까마귀쪽나무 열매의 정유성분이 대사증후군 개선 효능에 우수한 효과가 있는 것을 확인하고, 까마귀쪽나무 정유성분을 유효성분으로 함유하는 대사증후군 개선 효능을 갖는 조성물과 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0018] 이와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명인 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물은 까마귀쪽나무 열매로부터 획득되며, 상기 까마귀쪽나무 열매의 정유성분은, 종자(씨앗)이 제거된 (순수)열매로부터 획득된다.

[0019] 이러한 상기 까마귀쪽나무 열매의 정유성분은, 주정추출법, 헥산추출법, 초임계추출법, 증류법, 압착법 중 어느 하나의 방법으로 획득된다.

[0020] 상기 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물은 비만 및 인슐린저항성 개선효과 또는 항산화효과를 가짐을 특징으로 한다.

[0021] 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물의 제조방법은, 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물에서 까마귀쪽나무 열매의 정유성분은, 까마귀쪽나무 열매를 노말헥산에 첨가한 후 교반추출한 다음 헥산을 제거하여 정유성분을 획득하거나 또는 까마귀쪽나무 열매를 주정에 첨가한 후 교반추출한 다음 알코올을 제거한 후 HP-20 레진을 이용하여 정유성분을 획득하거나 또는 까마귀쪽나무 열매를 주정에 첨가한 후 상온에서 교반추출 한 다음 알코올을 제거하고, 물을 이용하여 정유성분 획득함을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0022] 상기와 같이 본 발명의 까마귀쪽나무 열매로부터 획득되는 정유성분(Oil)에는 Beta-cubebene (22.96%), Beta-selinene (11.23%), Gamma-Elemene (10.21%), Beta- Caryophyllene (7.37%)을 함유하고 있는 것으로 분석되었으며, 실험결과 지방세포 분화억제 효과 및 ROS 생성억제 효과 등이 우수하여 대사증후군 개선용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0023] 즉, 까마귀쪽나무 열매로부터 획득되는 정유성분(Oil)은, 지방축적량 관찰을 통하여 비만개선효과 평가에서 우수한 효능을 나타냄을 확인하였으며, 또한 대사증후군의 질환과 관계가 있는 ROS 생성억제효과 평가를 통하여 우수성을 확인하였다.

[0024] 따라서, 까마귀쪽나무 열매로부터 얻어지는 정유성분은 대사증후군 질환 개선(예방 및 치료)에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 실시 예인 까마귀쪽나무 열매의 정유성분이 Oil Red O staining을 이용한 지방축적량 실험의 결과를 나타낸 그래프.

도 2는 본 발명의 실시 예에 따른 까마귀쪽나무 열매의 정유성분이 ROS 생성억제효과에 대한 실험의 결과를 나타낸 그래프.

도 3은 본 발명의 실시 예에 따른 까마귀쪽나무 열매의 정유성분이 3T3-L1 지방세포의 분화과정에서의 세포내 지방축적 개선효과와 ROS의 생성억제효과를 나타낸 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 될 것이며, 본 명세서에 기재된 실시 예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시 예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0027] 본 발명은 까마귀쪽나무를 이용한 대사증후군 개선 효능을 갖는 조성물에 관한 것으로서, 까마귀쪽나무 열매로부터 획득되는 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하여 대사증후군 개선 효능을 가지는 이루어진 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 유효성분으로 하는 대사증후군 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관하여 제공한다.

[0028] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명에 따른 조성물의 유효성분인 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil)은, 까마귀쪽나무 열매 중 종자(씨앗)를 제거한 열매로부터 정유성분(Oil)을 획득하도록 하는 것이 바람직하다.

[0030] 이러한, 상기 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil)은 하기와 같은 방법으로 제조된다.

[0031] 까마귀쪽나무의 열매(종자를 제외한 것)로부터 정유성분을 추출하는 방법으로는, 본 발명의 헥산을 이용한 실시예 이외에도 초임계추출방법, 증류법, 압착법 등의 방법이 사용될 수도 있으며, 이를 이용하여 정유성분의 획득이 가능하다. 그러나 증류법과 압착법을 이용하는 경우 추출되는 정유성분의 양이 적은 단점을 가진다.

[0032] **- 주정을 이용한 단계적 추출방법 1**

[0033] 건조된 까마귀쪽나무의 종자를 제거한 순 열매(이하 '열매'라 칭함)에 용매인 주정 95%로 추출한 다음, 알코올을 제거하고 합성흡착제인 HP-20 레진을 이용하여 정유성분을 수득한다(까마귀쪽나무 열매 100g을 사용하였을 경우 15g의 정유성분(Oil)을 수득하였다).

[0034] **- 주정을 이용한 단계적 추출방법 2**

[0035] 건조된 까마귀쪽나무 열매(종자를 제외한 것)에 용매인 주정 95%로 추출한 다음, 알코올을 제거하고, 물을 넣어 층 분리 등의 공정을 통하여 정유성분을 수득한다(까마귀쪽나무 열매 100g을 사용하였을 경우 17g의 정유성분(Oil)을 수득하였다).

[0036] **- 헥산을 이용한 추출방법 1**

[0037] 건조된 까마귀쪽나무 열매(종자를 제외한 것)에 용매인 노말헥산(n-hexane)을 중량대비 9~11배수(바람직하게는 10배수)를 투입한 다음 상온(15~25℃)에서 24시간 동안 교반하여 추출한 다음 헥산(hexane) 층을 제거하여 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 수득한다.

[0038] **- 헥산을 이용한 추출방법 2**

[0039] 건조된 까마귀쪽나무 열매(종자를 제외한 것)를 초고압처리를 한 후, 용매인 노말헥산(n-hexane)을 중량대비 9~11배수(바람직하게는 10배수)를 투입한 다음 상온(15~25)에서 24시간 동안 교반하여 추출한 다음 헥산(hexane) 층을 제거하여 까마귀쪽나무 순수열매의 정유성분(Oil)을 수득한다.

[0040] 이와 같은 방법으로 획득되는 본 발명의 까마귀쪽나무 열매의 정유성분은 대사증후군 개선 효과가 우수하다. 따라서, 본 발명에 따른 까마귀쪽나무 열매 정유성분은 대사증후군과 관련된 의약품 및 건강기능식품의 조성물(원료)로도 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 함유하는 조성물은 까마귀쪽나무 열매 정유성분은 대사증후군 개선 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수도 있다.

[0042] 본 발명의 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 함유하는 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추

가로 약학적으로 허용가능 한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수도 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있다.

[0043] 이러한 본 발명의 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 함유하는 조성물은, 대사증후군 개선(예방 또는 치료)을 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수도 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 함유하는 조성물은 대사증후군 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가되어 사용될 수도 있다.

[0045] 상기 본 발명의 까마귀쪽나무 열매(종자를 제외한 것)의 정유성분(Oil)을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil)을 그대로 첨가하거나, 또는 이의 분획물을 사용하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.

[0046] 상기 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil)을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제 및 비타민 복합제 등으로 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0047] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시 예를 제시한다. 그러나 하기의 실시 예는 본 발명을 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시 예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0048] **실시 예 1 : 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil) 제조**

[0049] 동결건조된 까마귀쪽나무(Litsea japonica) 열매(종자를 제외한 것) 500g에 95% 주정 5,000㎖를 첨가하여 상온(20℃)에서 24시간 동안 교반추출 한 다음 알코올을 제거하고, 물을 넣은 첨가하는 공정을 단계적으로 추진하여 까마귀쪽나무의 열매의 정유성분 85g을 수득하였다.

[0050] **실시 예 2 : 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil) 제조**

[0051] 동결건조된 까마귀쪽나무(Litsea japonica) 열매(종자를 제외한 것) 500g에 노말헥산(n-hexane) 5,000㎖를 첨가하여 상온(20)에서 24시간 동안 교반추출 한 다음 헥산을 제거하여 까마귀쪽나무 열매의 정유성분 95g을 수득하였다.

[0052] **실시 예 3 : 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil) 제조**

[0053] 동결건조된 까마귀쪽나무 열매(종자를 제외한 것) 100g을 초고압처리를 한 후, 노말헥산(n-hexane) 1,000㎖를 첨가하여 상온(20)에서 24시간 동안 교반추출 한 다음 헥산을 제거하여 까마귀쪽나무 열매의 정유성분 95g을 수득하였다.

[0054] **실시 예 4 : 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil) 제조**

[0055] 동결건조된 까마귀쪽나무(Litsea japonica) 열매(종자를 제외한 것) 500g에 95%주정 5,000㎖를 첨가하여 상온(20℃)에서 24시간 동안 교반추출 한 다음 알코올을 제거하고, HP-20 레진을 이용하여 까마귀쪽나무 열매의 정유성분 75g을 수득하였다.

[0056] **실험 예 1 : 까마귀쪽나무 열매의 정유성분에 대한 성분분석**

[0057] 상기 실시 예 1 내지 4 중 실시 예 2에 따라 얻어진 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil)의 성분분석실험을 수행하였다.

[0058] **실험방법 :** 기기는 Shimadzu, QP2010Plus를 사용하였으며, Column은 RTX-5(30m x 0.25mm, 0.25㎛)을 사용하였고, 기타조건으로는 Injection 온도 250, Detector 온도 250, Mass range(m/z) 30-400, Injection volume 1㎕으로 분석하였다.

[0059] **실험결과 :** 상기 실시 예 2에 따라 얻어진 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil)을 분석하여 [표 1]과 같은 결과를 얻었다.

[0060] 이 오일 중에서 Beta-cubebene(22.96%), Beta-selinene(11.23%), Gamma-Elemene(10.21%), Beta-Caryophyllene(7.37%)을 함유되어 있었음.

표 1

[0061] 실시 예 2에 따라 얻어진 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil) 분석표

Compound Name	Area(%)	peak	
beta-cubebene	22.96	14	
beta-selinene	11.23	15	
Gamma-Elemene	10.21	16	
beta-Caryophyllene	7.37	8	

[0062] **실험 예 2 : 까마귀쪽나무 열매의 정유성분의 지방축적량 관찰**

[0063] 상기 실시 예에 따라 얻어진 까마귀쪽나무 열매의 정유성분에 대하여 항비만 효과를 검토확인하기 위해 Oil Red O staining을 이용한 지방축적량 실험을 수행하였다.

[0064] **실험방법 :**

[0065] **3T3-L1 세포배양 및 분화 :** 3T3-L1 전구지방세포는 실험목적에 따라 24-well에 각각 1×10^6의 seeding한 후, BS(10%) 및 P/S(1%)를 함유한 고농도 포도당 DMEM 89%에서 100% confluence될 때까지 배양하였다. 이로부터 2일 후에, 지방세포 분화유도 물질 (10 ㎍/mL insulin, 1 μM DEX, 0.5 mM IBMX)과 FBS (10%) 및 P/S (10%)를 함유한 DMEM으로 전지방세포를 지방세포로 분화유도 하였다.

[0066] 지방세포 분화 (day 0)시 DMEM에 A 및 B시료는 100, 200 ㎍/mL를 처리하였고, C시료는 12.5, 25 ㎍/mL 처리하여 지방세포의 분화억제 효과 및 세포내 지방축적의 변화를 관찰하였다.

[0067] 지방세포의 분화는 분화유도 물질을 처리한 후, 2일마다 지속적으로 10 ㎍/mL insulin, 1% P/S, 10% FBS가 함유된 배지에 각각의 시료를 처리한 후, 6일 동안 분화시키면서 지방축적량 및 ROS의 생성량을 관찰하였다.

[0068] **Oil Red O staining을 이용한 지방축적량 관찰 :** 분화과정에 따른 3T3-L1 세포내 지방축적량을 측정하고자 각각의 시료를 처리하여 24-well에서 8일 동안 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후, 10% formalin 용액 500㎕를 첨가하여 5분간 실온에서 방치하였다.

[0069] 동량의 formalin 용액으로 분화된 3T3-L1 세포 1시간 이상 실온에서 방치한 후, formalin을 제거하고 60% isopropanol 용액 500㎕로 세척하여 세포를 완전히 건조시켰다.

[0070] 완전히 건조된 세포들은 미리 제조해 둔 Oil red O working solution (Oil red O : DDW = 6 : 4)으로 세포 내 축적된 지방성분들을 충분히 염색 한 후, 증류수를 이용하여 세포를 3~4회 세척하고 완전히 건조시켰다.

[0071] 세포내 축적된 지방성분과 결합한 Oil red O는 100% isopropanol을 이용하여 모두 용출시킨 후, ELISA를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0072] **실험결과 :** 본 발명의 실시 예에 따라 얻어진 까마귀쪽나무 열매의 정유성분에 대하여 항비만 효과를 측정하기 위하여 Oil Red O staining을 이용한 지방축적량 실험을 수행한 결과를 도 1과 도 3으로 나타내었다.

[0073] 3T3-L1 지방세포의 분화과정에서의 시료에 의한 세포내 지방축적량 실험은, 3T3-L1 전지방세포에 세포분화 유도물질을 처리하고, 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 각각 12.5, 25 ㎍/mL 농도씩 처리하여 6일간 지방세포로 분화하였으며, 분화된 지방세포에 축적된 지방의 함량은 Oil red O staining 방법을 이용하여 측정하였다.

[0074] 지방세포의 분화과정 동안, 대조군의 3T3-L1 세포에는 다량 lipid drop을 세포내에 축적하였다. 까마귀쪽나무열매 정유성분 12.5 ㎍/mL에서 75%의 지방생성을 나타내었고, 25 ㎍/mL에서는 32%로 나타내었다. 이는 양성대조군(positive control)으로 사용된 NAC(5 mM)보다 지방세포 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

[0075] **실험 예 3 : 까마귀쪽나무 열매의 정유성분의 ROS 생성억제효과**

[0076] 상기 실시 예에 따라 얻어진 까마귀쪽나무열매 정유성분의 ROS 생성억제효과를 검토확인하기 위하여 NBT assay

를 이용한 ROS 함량을 측정하는 실험을 수행하였다.

[0077] **실험방법 :** 분화과정에 따른 지방세포의 ROS 생성량을 측정하기 위하여 먼저 24-well에 배양 및 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후 멸균된 PBS(Phosphate buffer saline, pH 7.4)를 이용하여 2회 세척, 0.2% NBT 용액 0.3 mL를 첨가하여 CO_2 incubator안에서 90분간 반응시켰다. 지방세포 내에 축적된 ROS들은 NBT 용액과 반응하여 dark blue formazan을 생성하게 되며, DMSO와 1N KOH(7:3)를 혼합하여 이들 dark blue formazan을 모두 용출시킨 후, 증류수로 희석하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0078] **실험결과 :** 본 발명의 실시 예에 따라 얻어진 까마귀쪽나무 열매의 정유성분에 대하여 대사증후군개선 효과를 측정하기 위하여 NBT assay를 이용한 ROS 함량을 측정한 결과를 도 2과 도 3으로 나타내었다.

[0079] 3T3-L1 전지방세포에 세포분화 유도물질을 처리하고 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 각각 12.5, 25 ㎍/mL 농도씩 처리하여 6일 후 세포내 ROS 생성량은 NBT assay 방법을 이용하여 평가하였다. 지방세포의 분화과정 동안, ROS의 생성도 증가하는 것으로 나타났다.

[0080] 까마귀쪽나무 열매의 정유성분을 12.5 ㎍/mL에서 74%, 25 ㎍/mL에서는 44%로 나타났다. 이는 양성대조군(positive control)으로 사용된 NAC(5 mM)보다 ROS 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

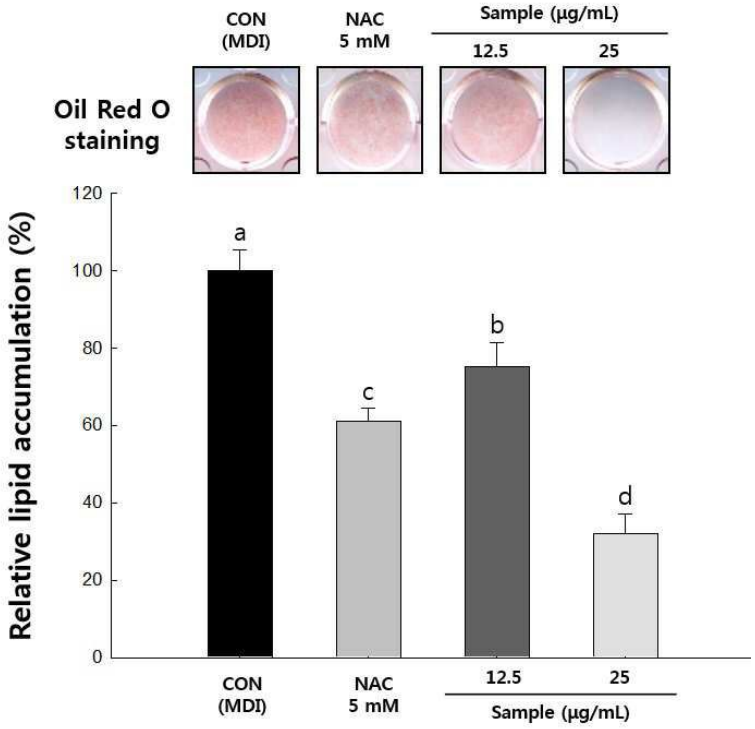
산업상 이용가능성

[0081] 본 발명의 까마귀쪽나무의 열매로부터 추출되는 까마귀쪽나무 열매의 정유성분(Oil)은 전술되어 있는 실험에서와 같이 대사증후군 질환의 예방 및 치료효과가 우수하다.

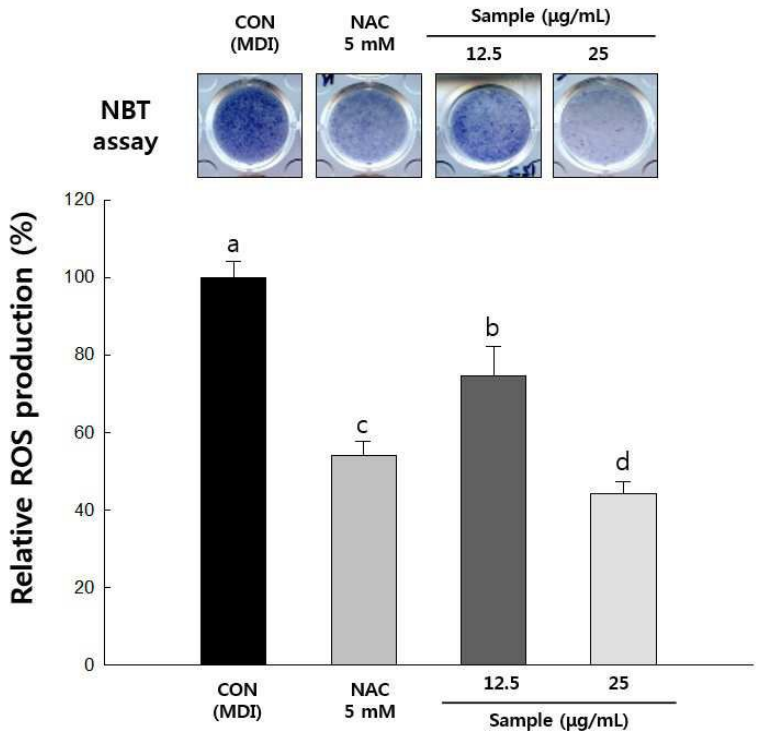
[0082] 따라서, 본 발명에 따른 까마귀쪽나무 열매의 정유성분은 대사증후군 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면

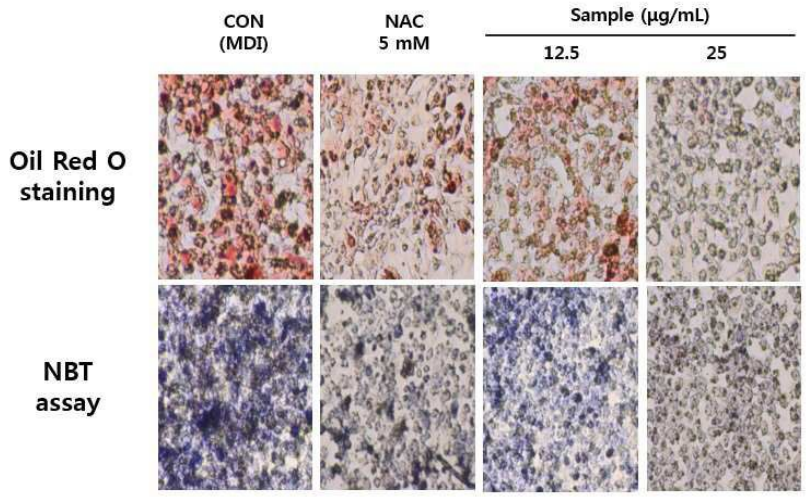
도면1



도면2


CON
(MDI)
NAC
5 mM
Sample (μg/mL)
12.5
25
NBT
assay
Relative ROS production (%)
120
100
80
60
40
20
0
a
b
c
d
CON
(MDI)
NAC
5 mM
12.5
25
Sample (μg/mL)

도면3


CON
(MDI)
NAC
5 mM
Sample (μg/mL)
12.5
25
Oil Red O
staining
NBT
assay