(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0000471
(43) 공개일자 2016년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/84 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0076933
(22) 출원일자 2014년06월24일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
농업회사법인 다하누㈜
강원 영월군 주천면 솔치로 724
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 후석로 325, 105동 301호 (후평동, 춘천더샵아파트)
황 파
강원도 춘천시 한림대학길 1, 생명과학관 5층 8510호 (옥천동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 정안

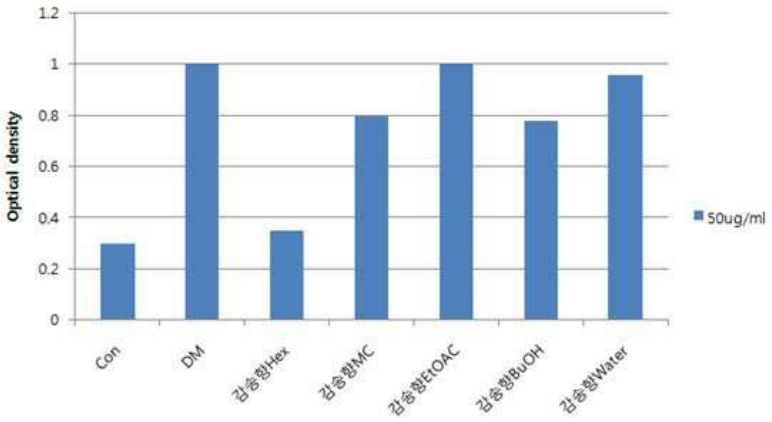
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **감송향 추출물 또는 분획물을 포함하는 비만의 개선, 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만의 개선, 예방 또는 치료용 조성물, 및 이러한 조성물을 포함하는 기능성 식품에 관한 것으로, 본 발명의 조성물, 및 식품은 비만 세포 분화 억제 활성을 지녀 비만의 개선, 예방 및 치료에 매우 유용하다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최 면

강원도 춘천시 동면 만천로 107, 102-502 (한일유앤아이아파트)

장영수

강원 횡성군 횡성읍 향교서로 1

이수경

강원도 춘천시 서부대성로 327, 102동 601호 (후평동, 동아아파트)

김기노

강원도 원주시 만대로 16-20 (무실동)

권신화

경기 남양주시 호평로 149, 1907동 1003호 (호평동, 호평마을중흥에스-클래스로하스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	B0008864
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	한국산업기술진흥원
연구사업명	지역혁신센터조성사업(RIC)
연구과제명	식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터
기 여 율	1/1
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2013.03.01 ~ 2014.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

감송향 (Nardostachys chinensis BATAL) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약제 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 추출물이 C_1-C_4 알코올 추출물임을 특징으로 하는, 비만의 예방 또는 치료용 약제 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 분획물이 n-헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물임을 특징으로 하는, 비만의 예방 또는 치료용 약제 조성물.

청구항 4

감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 추출물이 C_1-C_4 알코올 추출물임을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 분획물이 n-헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물임을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 7

제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 희석제, 분산제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 보조제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물.

청구항 8

제 4항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만의 개선, 예방 또는 치료용 조성물, 및 이러한 조성물을 포함하는 기능성 식품에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 비만 세포 분화 억제 활성을 지녀 비만의 개선, 예방 및 치료에 매우 유용한 감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물, 및 이를 포함하는 기능성 식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비만은 음식물로 섭취한 에너지와 신체활동으로 소비한 에너지 간의 불균형에 의하여 과잉의 에너지가 체지방으로 축적되는 현상이다. 일반적으로 비만이란, 지방 조직이 과잉으로 몸에 축적된 상태를 말하며, 건강 진단 등에서 이용되는 BMI(Body Mass Index(체격 지수), 체중(kg)을 신장(m)의 제곱으로 나눈 것)에서, BMI가 22가 되는 체중을 표준 체중이라고 하고, 그것보다 1할 이상 많은 체중을 과체중, 2할 이상 많은 체중을 비만이라고 한

다. 이러한 비만 상태가 오랜 시간에 걸쳐 지속되면 당뇨병, 고지혈증, 심장병, 뇌졸증, 동맥경화증, 지방간 등의 각종 대사성질환과 성인병이 유발된다. 최근 과다한 열량 섭취와 운동 부족으로 인하여 서구 선진국뿐만 아니라 우리나라에서도 비만 인구가 급증하고 있으며 이는 심각한 사회문제로 대두되고 있다.

[0003] 비만은 과잉의 에너지 공급이 지방세포 크기와 수의 증가를 유발하여 체내 지방으로 축적되는 것이 주된 발생 원인으로 알려져 있으며, 이 외에도 유전적 요인, 서구화된 식생활에 의한 환경적 요인, 심리적 요인, 에너지 대사 이상 등 다양한 원인이 작용한다고 알려져 있다.

[0004] 비만을 예방 또는 해소하기 위해서는, 식사 요법이나 운동 요법 등의 생활 습관의 개선이 바람직하지만, 용이하게 행할 수 있는 것은 아니다. 또한, 비만에 대한 치료로서는, 지질 흡수 저해제, 소화 흡수 저해제 등의 약물 요법도 있지만, 그 사용은, 중증의 비만증에 한정되어 있다. 이러한 중에, 다채로운 작용을 갖고, 장기간 복용하더라도 부작용 등의 우려가 적은 천연물 유래 성분을 이용한 다양한 물건이 다이어트 식품 등으로서 비만의 예방이나 해소를 위해 판매되고 있고, 또한 새로운 항비만 활성을 갖는 물질에 대한 연구가 계속되어오고 있다.

[0005] 예를 들면, 일본 특허 공개 제2004-091464호는 황파의 잎 또는 나무 껍질의 건조 분말, 추출물 또는 정제물이 래트나 인간에 있어서 체중 감소 효과를 가짐을 개시하고 있다. 또한, 일본 특허 공개 제2002-051735호는 폴리페놀의 일종인 탄닌이 α-아밀라아제 저해 효과를 갖고 항비만 효과를 갖는 것을 개시하고 있다.

[0006] 감송향(甘松香)(*Nardostachys chinensis BATAL* 또는 *Nardostachys chinensis*)은 외형이 활모양으로 구부러진 원주모양이며 바깥면은 흑갈색이며 자른면은 황색이 도는 갈색이다. 바깥면은 쭈글쭈글하고 원뿌리가 길고 두터우며 수염뿌리가 달려 있으며 질은 부드럽고 꺾이기 쉽다. 피층은 짙은 갈색으로 갈라져서 조각을 이루고 목부는 황백색이다. 바깥면은 황갈색 내지 갈색으로 광택이 있고 5~6개의 세로 주름과 그 사이에 불규칙한 주름이 있으며 단단하다. 감송향은 히말라야에서 유래해서 고대부터 진통제의 재료이며 유태인들의 결혼식에 사용하는 향유 중 하나인 나드향으로 알려져 있다.

[0007] 이러한 감송향은 배가 그득한 느낌, 복통, 기운을 아래로 내리는 효과가 있으며, 검버섯, 기미, 영양장애를 동반한 부스럼, 충치, 치질을 치료하며 원기를 돕고 기가 막힌 것을 소통시키는 것으로 한방에서 알려져 있으며, 각기병과 무릎 부종에 외용하기도 한다. 또한, 감송향의 추출물은 급성 췌장염의 예방 및 치료에 사용되는 것으로 알려진 바 있으며(한국공개 10-2010-0095838), 사이토카인에 의한 면역반응을 억제하여 췌장의 β-세포를 보호함으로써 제1형 당뇨병을 예방 및 치료하는 것으로 보고된 바도 있다(한국공개 10-2011-0098500).

[0008] 그러나, 비만 세포 분화를 억제함으로써 비만을 개선, 예방 및 치료할 수 있는 감송향 추출물 또는 분획물에 관해서는 보고된 바 없으며, 특허 역시 없는 실정이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 감송향 추출물과 감송향 분획물이 비만 세포 분화 억제 활성을 지녀, 비만의 개선, 예방 및 치료에 효과가 있음을 새롭게 확인하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 비만의 예방 및 치료를 위한 약제 조성물 및 이를 이용한 비만의 치료방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 비만의 예방 및 개선을 위한 기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 비만 세포 분화 억제 활성을 지녀 비만의 예방 및 개선에 매우 유용한 기능성 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 양태로서, 감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약제 조성물이 제공된다.

[0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물이 제공된다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 포함하

는 비만 예방 또는 개선용 기능성 식품이 제공된다.

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약제 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 약제 조성물은 비만 세포의 분화 억제 활성을 지님으로써 비만의 예방 또는 치료에 효과를 지닌다.

[0019] 본 발명에서 감송향은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다. 본 발명에서 감송향은 잎, 줄기, 열매, 뿌리, 전초를 포함한 전체 부위가 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 비만을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0021] 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 비만에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0022] 본 발명에서 비만의 예방 또는 치료 활성은 비만 세포 분화 억제능을 통해 시험하였다.

[0023] 본 발명에서 추출물(extract)은 천연물로부터 분리된 활성성분을 의미하며, 여기서는 감송향으로부터 분리된 물질을 의미한다. 상기에서 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 여과법 및 환류 추출법 등 당업계의 통상적인 추출방법일 수 있다. 바람직하게는 세척 및 건조로 이물질이 제거된 감송향을 물, C_1-C_4의 알코올(예컨대, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있다. 더 바람직하게는, 본 발명에서 사용되는 추출물은 에탄올 추출물이며, 가장 바람직하게는 70%의 에탄올 추출물이다. 추출용매는 감송향의 건조중량의 2 내지 20 배로 하는 것이 바람직하다. 용매로 추출한 이후에는 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가로 수행할 수 있다.

[0024] 한편, 본 발명에서 감송향 분획물은 상기 감송향 추출물로부터 분획하여 얻을 수 있다. 상기 감송향 분획물을 수득하기 위한 분획 용매는 유기 용매이다. 보다 구체적으로, 상기 감송향 분획물은 감송향 추출물을 물 (증류수)에 현탁시킨 후 n-헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 n-부탄올로 각각 분획함으로써, n-헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물로 얻을 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 바람직한 감송향 분획물은 n-헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 분획물이다. 가장 바람직한 감송향 분획물은 n-헥산 분획물이다. 상기에서, 분획은 분별깔때기를 이용하여 수행할 수 있다.

[0025] 상기 본 발명의 약제 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 상기 약제 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0027] 상기 본 발명의 약제 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여된다.

[0028] 본 발명에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여

하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0029] 본 발명의 약제 조성물은 비만의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0030] 한편, 본 발명은 비만의 예방 또는 치료용 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 비만의 발병 또는 발병 가능성이 있는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 비만의 치료방법을 제공한다.

[0031] 본 발명에서 용어, "개체"란 이미 비만 상태이거나 비만이 될 위험이 있는 인간을 포함한 모든 포유동물을 의미하고, 본 발명의 추출물 또는 분획물을 포함하는 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약제 조성물로 비만 상태인 인간을 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 약제 조성물은 기존의 비만 예방제 또는 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.

[0032] 상기 약제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 약제 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 약제 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 개선을 위한 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 비만 세포 분화 억제 활성을 지님으로써 비만의 예방 및 개선에 효과를 지닌다.

[0035] 본 발명에서 감송향은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 비만의 예방 또는 치료 활성은 비만 세포 분화 억제능을 통해 시험하였다.

[0037] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 희석제, 분산제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 유기산, 인산염, 항산화제, 유당 카제인, 덱스트린, 포도당, 설탕, 솔비톨, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 천연 또는 합성 풍미제, 착색제, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 포함할 수 있다. 유기산은 이에 제한되는 것은 아니지만 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산 또는 사과산일 수 있으며, 인산염은 이에 제한되는 것은 아니지만 인산나트륨, 인산칼륨, 산성피로인산염 또는 폴리인산염(중합인산염)일 수 있으며, 항산화제는 이에 제한되는 것은 아니지만 폴리페놀, 카테킨, α-토코페롤, 로즈마리 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산 또는 피틴산 등의 천연 항산화제일 수 있다.

[0038] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 정제, 환제, 과립제, 분말제, 액제, 경질캅셀제, 연질캅셀제 등과 같은 일반적인 제형으로 제조될 수도 있으며, 죽, 빵, 음료, 바, 초콜릿, 쿠키, 차, 드링크제, 비타민 복합제, 육류, 소시지, 캔디, 면, 젤리 등과 같은 임의의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물을 음료 형태로 제조하는 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사 카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 해당된다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0039] 상기와 같은 여러 제형 또는 형태를 제조하기 위해, 전술한 부형제들과 같은 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 사용할 수 있으며, 제조하고자 하는 제형 또는 형태의 제조에 당해 기술분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 전술한 본 발명의 기능성 식품 조성물을 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 기능성 식품을 제공한다.

[0041] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초

콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

발명의 효과

[0042] 본 발명에 따른 감송향 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 비만의 개선, 예방 및 치료 효과가 우수하면서도 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 조성물이므로, 비만의 치료 등에 보다 안전하게 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명의 감송향 추출물 및 분획물을 사용한 경우의 adipogenesis 억제 정도를 도시한 사진 및 그래프이다. 해당 그래프에서 "C"는 "컨트롤(Control)"; "DM"은 "Differentiation Medium (cat # DM-2-L1)" (DM군과 모든 시료군에 처리하여 세포분화를 유도한 후에 유도된 세포분화를 억제하는 것을 확인할 수 있음); "감송향 Hex"는 "감송향 n-헥산 분획물"; "감송향MC"는 "감송향 디메틸클로라이드 분획물"; "감송향EtOAc"는 "감송향 에틸아세테이트 분획물"; "감송향BuOH"는 "감송향 n-부탄올 분획물", "감송향Water"는 "감송향 물 분획물"을 나타낸다.

도 2는 C57BL/6 마우스를 이용한 감송향 헥산 분획물의 항비만 실험 결과를 도시한 것이다.

도 3은 감송향 추출물 및 분획물의 박층크로마토그램을 도시한 것이다.

도 4는 용매별 분획 물질분포를 분석한 HPLC 데이터이다.

도 5는 감송향의 헥산 분획물의 물질분포를 분석한 HPLC 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 본 발명의 구체적인 구성 및 작용을 실시예 및 실험예에 의하여 내용을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 위한 예시일 뿐 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] **제조예 1: 감송향 추출물의 제조**

[0046] 감송향을 세척 및 건조시킨 후, 건조된 감송향의 뿌리 30g을 Sonication을 이용하여 70%의 에탄올로 추출하였다. 상기 추출 과정을 2회 반복하여 얻어진 감송향 추출액을 45℃ 이하의 온도에서 감압 농축하여 추출물을 수득하였다.

[0047] **제조예 2: 감송향 분획물의 제조**

[0048] 상기 제조예 1에서 수득한 감송향 추출물 3g을 증류수에 현탁시킨 후 n-헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 n-부탄올로 각각 순차적으로 분획하여, n-헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물을 수득하였다.

표 1

[0049]

Sample	량(mg)
n-Hex layer	478.4
MC layer	701.7
EtOAc layer	84
n-BuOH layer	131.4
Water layer	884.3

[0050] **실험예 1: 감송향 추출물 및 분획물의 박층크로마토그램(Thin Layer Chromatography, TLC)를 이용한 성분 분석 시험**

[0051] 물질 분포를 확인하기 위하여, TLC(Thin layer chromatography, silicagel 60(Merk Co. USA) F254 precoated사용)에 시료(감송향) 10mg/ml 농도로 메탄올에 용해한 후, 10ul 점적한 후 전개용매(헥산:에틸아세테이트=1:1)에 전개하였다. 전개 후 UV (254, 366 nm)로 관찰하고 이를 도 3에 나타내었다.

[0052] **실험예 2: HPLC를 이용한 용매별 분획 물질분포 분석 시험**

[0053] 분석 칼럼은 Agilent Eclips XDB-C18 (5m, 4.6 * 150 mm i.d.) flow rate 0.7 mL/min, 이동상 water(0.1% Formic acid) (A)와 메탄올 (B)을 사용하여 0분 A:B=100:0, 25분 A:B=0:100, 28분 A:B=0:100, 30분 A:B=100:0, 40분 A:B=100:0 로 분석하고 UV 254 nm에서 검출하여 피크를 확인하고, 이를 도 4에 도시하였다.

[0054] 또한, 항비만에서 효능을 보이는 감송향의 헥산 분획물의 물질분포를 분석하고 이를 도 5에 나타내었다.

[0055] **실험예 3: 지방 세포 분화 억제 실험**

[0056] 지방전구세포 (pre-adipocyte cell) 3T3-L1을 상기 제조예 1에서 수득한 감송향 에탄올 추출물, 및 상기 제조예 2로부터 수득한 감송향 n-헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물 각각 50㎍/㎖로 처리한 후 8일째 지방염색법 (Oil red O)을 이용하여 감송향 추출물 및 분획물의 지방세포 형성 억제 정도를 시험하였다. 구체적인 시험 내용은 다음과 같다:

[0057] **실험예 3-1: 지방 세포의 분화 유도**

[0058] ATCC (American Type Culture Collection)로부터 지방전구세포 3T3-L1을 구입하여 사용하였다. 세포 배양은 10% 소태아혈청 (FBS), 페니실린 (100U/㎖), 스트렙토마이신 (100U/㎖)을 포함하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지 (Gibco)를 사용하였으며, CO_2 배양기에 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 세포를 6-웰 플레이트에 씨딩 (seeding)하고, 세포가 포스트-융합 (post-confluent) 할 때 호르몬 칵테일 (hormone cocktail)인 0.5mM 덱사메타손, 10㎍/㎖ 인슐린 및 0.5mM IBMX로 처리하였다. 이틀에 한 번 배지를 갈아주었으며, 4일 후에 배지를 인슐린 5㎍/㎖로 바꿔주고, 이틀 뒤에 다시 정상 배지로 갈아주어 지방세포로의 분화를 유도하였다. 상기 제조예 1 및 2의 에탄올 추출물, n-헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물 각각 50㎍/㎖를 지방세포 분화 시에 처리하였으며 피오글리타존을 양성 대조군 (positive control)으로 사용하였다.

[0059] **실험예 3-2: MTS 어세이**

[0060] 세포 밀도가 5×10^4가 되도록 3T3-L1 세포를 96-웰에 깔고 부동한 농도의 시약들을 처리하여 세포의 생존력 (viability)을 관찰하였다. 분화 유도 전에 상기 제조예 1 및 2의 에탄올 추출물, n-헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물로 처리하고, 24시간, 48시간 후에 각각 MTS 시약을 20㎕ 넣고 30분 동안 37℃에서 인큐베이션시킨 다음, 450nm에서 OD 값을 측정하였다.

[0061] **실험예 3-3: 지방염색법 (Oil Red O staining)**

[0062] 상기 제조예 1 및 2의 에탄올 추출물, n-헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물 시약들 각각의 지방 생성 억제 효과를 확인하기 위해 지방 분화 배지와 각 시약들을 동시에 처리하여(감송향 추출물 및 분획물을 각각 50㎍/㎖처리) 8일 후 분화된 세포의 배지를 버리고 1×PBS에 3회 세척한 후 10% 포르말린시약에 고정시켰다. 1시간 후 0.6% Oil Red O 시약에 염색시키고 다시 상대적인 TG의 OD값을 측정하였다.

[0063] **실험 결과**

[0064] 상기 실험 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, 감송향 에탄올 추출물, n-헥산 분획물, 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물로 처리한 경우 지방 세포 분화 억제 효과가 있음을 확인하였다. 특히, 감송향의 n-헥산 분획물의 경우, 지방 세포 분화 억제 효과가 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

[0065] **실험예 4: C57BL/6 마우스를 이용한 항비만 실험 (*in vivo*)**

[0066] 실험동물은 브릿지에서 구입하였으며, C57BL/6N 5주령을 사용하였다. 먼저, 마우스를 7일간 동물실험실에 적응시켰다. 1 그룹당 마우스 8마리씩, 총 5개 그룹으로 나눈 후 1 그룹은 대조군으로 정상식이를 주고, 2 그룹은 고지방식 (High Fat Diet)만 주고, 나머지 그룹은 고지방식을 줌과 동시에 저농도 감송향 분획물 (100mg/kg) (3 그룹), 고농도 감송향 분획물 (200mg/kg) (4 그룹), Orlistat 30mg/kg (5 그룹)을 각각 하루에 한번 씩 경구로 8주 동안 투여하였다 (도 2). 매주 동일한 요일과 시간을 정하여 실험동물들의 식이, 체중을 측정하였다. 8주 후 실험동물들을 충분히 마취시킨 후 개복하여 심장 채혈하여 얻은 혈청으로 혈액 지표를 측정하였다. 5,000rpm에서 5분간 원심 분리한 후 혈청을 분석에 사용하여, 혈중 포도당 (plasma glucose), 중성지방 (Triglyceride), 총 콜레스테롤 (TC), LDL 콜레스테롤의 농도는 시판 키트 (Stanbio, USA)를 구입하여 생화학 분석기기 (SMARTLAB, USA)를 사용하여 측정하였으며, 혈중 인슐린 농도는 마우스 인슐린 ELISA 키트 (Shibayagi, Japan)를 구입하여 ELISA 리더 (Labsystems, Finland)로 측정하였다. 측정 결과는 도 2 및 아래

표 1에 나타내었다.

표 2

Parameter	RD	HFD	HFD+감송향 (mg/kg)	
			100	200
Initial body weight(g)	21.2±0.5	21.7±0.2	20.82 ±0.3	20.72 ±0.2
Final body weight(g)	27.6±0.6	34.1±0.4	26.95±0.7	25.60±0.4
Body weight gain(g)	6.8±0.2	13.4±0.5	6.13±0.4	4.88±0.2
Plasma glucose(mmol/l)	50.7±7.8	159.8±14.9	133 ±8.8	114 ±14.2
Plasma insulin(uU/ml)	45.3±2.3	112.3±10.8	75.6±6.8	54.9±12.9
Plasma lipids				
TG(mg/ml)	48.7±6.9	88.3±9.9	34 ±2.7	23 ±3.3
TC(uEq/liter)	50.8±4.0	116.1±5.6	55 ±3.8	36 ±4.7
LDL-cholesterol(mg/ml)	4.1±0.4	12.3±1.4	3 ±0.4	3 ±0.7

[0067]

[0068] 상기 값들은 평균값±S.E.(n=8)으로 나타낸 것이다.

[0069] RD: regular diet

[0070] HFD: high fat diet

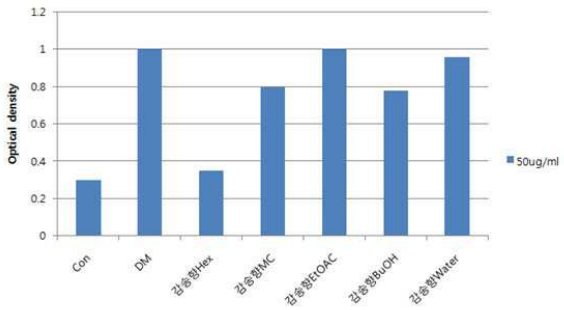
[0071] HFD+감송향 n-헥산분획물: HFD 투여 및 해당 농도 감송향 n-헥산분획물 처리

[0072] 혈액 채취를 통해 분석 결과 혈당, TG, LDL-cholesterol에서 High fat diet로 유도된 비만 쥐 그룹보다 유의적으로 감소된 것을 알 수 있었다. 또한, 도 2에서 볼 수 있듯이 HFD를 8주간 급이 시키며 비만을 유발하고 매일 경구 투여하여 매주 체중의 변화를 확인한 결과, 감송향 헥산 분획물을 투여한 경우 5주 후부터 현저한 체중 증가 억제 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

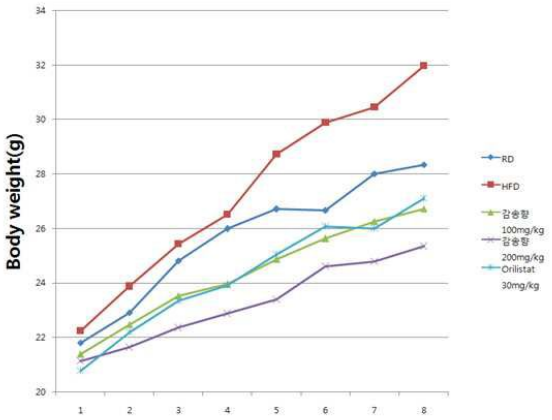
[0073] 또한, 혈액 채취를 통해 분석한 결과, 감송향 헥산 분획물을 투여한 경우 고지방식으로 유도된 비만 쥐 그룹에 비해 혈당 감소, 혈중 인슐린 농도 감소, 인슐린 저항성 감소, TG 감소, TC 감소, LDL-콜레스테롤 농도 감소 등의 상당한 항비만 효과가 있음을 알 수 있었다 (표 1).

도면

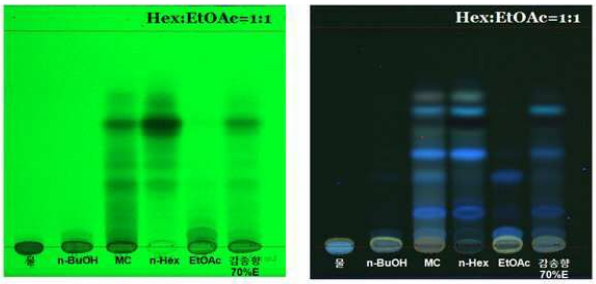
도면1



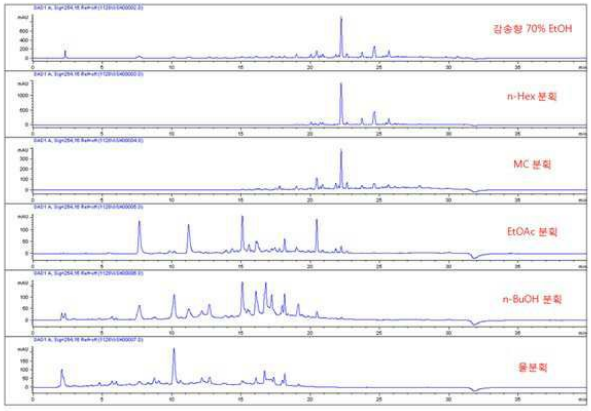
도면2


Body weight(g)
RD
HFD
감송향 100mg/kg
감송향 200mg/kg
Orlistat 30mg/kg

도면3


Hex:EtOAc=1:1
물
n-BuOH
MC
n-Hex
EtOAc
감송향 70%E
254nm
Hex:EtOAc=1:1
366nm

도면4


감송향 70% EtOH
n-Hex 분획
MC 분획
EtOAc 분획
n-BuOH 분획
물분획

도면5

