(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월04일
(11) 등록번호 10-1692889
(24) 등록일자 2016년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/83 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0002946
(22) 출원일자 2014년01월09일
심사청구일자 2014년11월26일
(65) 공개번호 10-2015-0083328
(43) 공개일자 2015년07월17일
(56) 선행기술조사문헌
Juan Su 외 8인. Journal of Chromatography A. Vol. 1216, 2009년, pp. 2111-2117*
KR1020120021709 A
KR1020100029559 A
KR1020120128579 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
오세량
대전광역시 유성구 과학로 125
안경섭
대전광역시 유성구 과학로 125
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 김미화

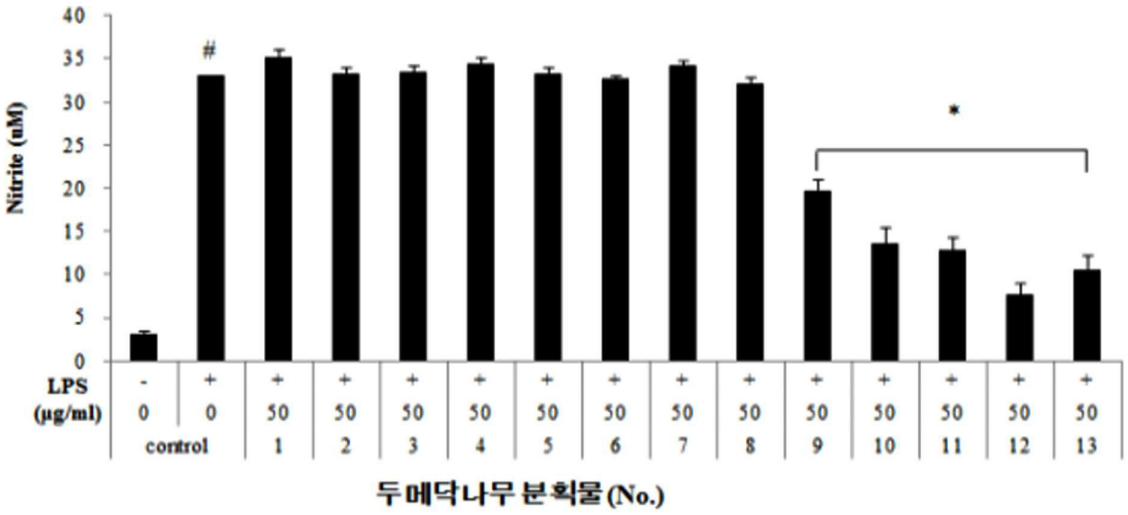
(54) 발명의 명칭 **두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 두메닥나무(*Daphne kamtschatica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방, 치료 및 개선용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물은 오랫동안 천연약재로 사용되어온 천연물에서 유래되어 부작용이 없으면서도, 염증관련 인자인 질소산화물(NO) 및 TNF-α의 생성을 억제하므로, 상기 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 치료에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

권옥경

대전광역시 유성구 과학로 125

류형원

대전광역시 유성구 과학로 125

김두영

대전광역시 유성구 과학로 125

김정희

대전광역시 유성구 과학로 125

송혁환

대전광역시 유성구 과학로 125

신인식

대전광역시 유성구 과학로 125

장승룡

충북 제천시 대학로 316, 창업보육센터 103호 (신월동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM1221312

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 천연물 유래 의약활성 전임상 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

두메닥나무(*Daphne kamtschatica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 천식의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1(C_1) 내지 4(C_4)의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 추출물은 메탄올로 추출한 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분획물은 두메닥나무의 메탄올 추출물을 물,탄소수 1(C_1) 내지 4(C_4)의 알코올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 분획하여 수득한 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 분획물은 두메닥나무를 물, 탄소수 1(C_1) 내지 4(C_4)의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 추출물을 액체 크로마토그래피에 적용한 후 60 내지 70% (v/v)의 메탄올 수용액으로 용출하여 수득한 것인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 분획물은 상기 두메닥나무 추출물을 액체 크로마토그래피에 적용한 후로부터 72분 내지 84분간 분획하여 수득한 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 두메닥나무(*Daphne kamtschatica*)는 두메닥나무 줄기, 잎 또는 이들의 혼합물인 것인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물에 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물은 NO(nitric oxide) 또는 TNF-α(Tumor necrosis factor-ahpha) 사이토카인의 생성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

두메닥나무(*Daphne kamtschatica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 천식의 개선용 식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1(C_1) 내지 4(C_4)의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것인 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 추출물은 메탄올로 추출한 것인 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 분획물은 두메닥나무의 메탄올 추출물을 물, 탄소수 1(C_1) 내지 4(C_4)의 알코올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 분획하여 수득한 것인 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 분획물은 두메닥나무를 물, 탄소수 1(C_1) 내지 4(C_4)의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 추출물을 액체 크로마토그래피에 적용한 후 60 내지 70% (v/v)의 메탄올 수용액으로 용출하여 수득한 것인 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 분획물은 상기 두메닥나무 추출물을 액체 크로마토그래피에 적용한 후로부터 72분 내지 84분간 분획하여 수득한 것인 조성물.

청구항 17

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 두메닥나무(*Daphne kamtschatica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방, 치료 및 개선용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증은 외부로부터 박테리아나 바이러스와 같은 외부 항원이 체내로 침입하거나 세포나 조직이 어떠한 원인에 의하여 손상 받았을 때 그 손상에 대한 조직 반응을 일컫는다. 염증세포는 종양의 개시, 증진에서 DNA 손상을 야기하는 활성 질소 및 산소종과 같은 다양한 염증전 매개인자를 방출한다. 염증은 크게 급성염증(acute inflammatory)과 만성염증(chronic inflammatory)으로 나뉘며, 만성적으로 염증반응이 일어날 경우 염증전 사이토카인과 케모카인이 과도하게 방출되어 주변 조직 손상과 더불어 종양세포의 내습, 전이, 이전 그리고 혈관신생을 증진시켜 종양의 성장을 돕는다.

[0003] 이렇듯 최근 분자생물학의 발달과 더불어 염증성 질환을 사이토카인 등의 분자 수준에서 이해하고자 하는 시도가 이루어지고 있으며, 이러한 질환에 영향을 주는 인자들도 하나씩 규명되고 있다. 이러한 인자 중에서, 질소산화물(NO; nitric oxide)은 염증 매개인자로서 병원성 DNA를 손상시키는 방어작용을 함으로써 항상성을 유지하는 역할을 한다(Kou and Schroder, Ann Sur 221, 220-235, 1995). NO는 질소산화물 합성효소(NOS)의 이성질체인, nNOS(neuronal NOS), eNOS(endothelial NOS) 및 iNOS(inducible NOS)의 3가지 주요 NOS에 의해 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 생성된다. 이 중 iNOS에 의해 과다 생성된 NO는, 초산화물(superoxide)과 반응하여 퍼옥시니트라이트(peroxynitrite)를 형성하고, 이는 강력한 산화제로 작용하여 세포에 손상을 입힘으로써 염증성 자극에 의해 대식세포를 활성화시킨다. 다양한 자극과 염증 매개인자에 의해 활성화된 대식세포는 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), prostaglandin E2(PGE2) 등의 다른 염증관련 인자를 생성하고 다른 면역세포들을 염증부위로 유도하고, 또한 NF-κB를 활성화시켜 염증반응, 암, 동맥경화 등 만성질환에 관여하는 것으로 알려져 있다(Lawrence et al., Nat Med., 7, 1291-1297, 2001).

[0004] 상술한 염증반응에 관여하는 인자의 세포내 수준을 조절하여 염증성 질환을 치료하려는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 초기에는 화학적 물질을 이용하여 상기 인자들의 세포내 수준을 조절하고자 하였으나, 부작용이 심하다는 단점이 있어, 최근에는 부작용이 없거나 매우 낮은 수준으로 나타나는 천연물 유래의 물질을 이용하여 상기 인자들의 세포내 수준을 조절하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0005] 한편, 두메닥나무(*Daphne kamtschatica*)는 한국의 한라산, 지리산, 태백산, 오대산 등 높은 산의 약간 서늘한 곳이나 북쪽 지방에서 주로 자라는 식물이다. 껍질은 한지의 원료로 사용하며 독성이 강한 열매를 약재로 사용하고 있다. 두메닥나무의 추출물의 활성과 관련하여는, 피부 미백활성에 대하여는 알려져 있으나(한국공개특허 제10-2012-0003267호), 항염활성에 대하여는 아직까지 알려진 바가 없다.

[0006] 이러한 배경 하에 본 발명자들은, 인체에 부작용을 유발하지 않으면서 염증성 질환 치료에 유용한 천연물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물이 독성을 나타내지 않으면서 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 두메닥나무(*Daphne kamtschatica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 두메닥나무(*Daphne kamtschatica*) 추출물 또는 이의 분

획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 구체적으로, 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명에서 용어, “두메닥나무(*Daphne kamtschatica*)”은 도금양목 팥꽃나무과의 낙엽활엽관목으로, 주로 한국(전남·강원·평북·함북)·사할린·캄차카·아무르·우수리 등지에 분포하며, 깊은 산의 나무 밑에서 자라는 식물이다. 높이는 30~40 cm이고 가지에 털이 없으며, 잎은 어긋나고 긴 달걀을 거꾸로 세운 모양으로 끝은 뾰족하거나 뭉뚝하다. 나무껍질은 종이 원료, 밧줄의 대용으로 쓰이고, 주로 관상용으로 사용되어 왔다.

[0012] 본 발명에서 용어, “두메닥나무 추출물”은 두메닥나무를 추출하여 수득한 추출물을 의미한다. 상기 두메닥나무 추출물은 두메닥나무 분쇄물을 건조 중량의 약 2 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올 등과 같은 탄소수 1(C_1) 내지 4(C_4)의 저급 알콜의 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매를 용출 용매로써 사용하고, 추출 온도는 20 내지 100℃, 바람직하게는 실온에서, 추출 기간은 약 12시간 내지 4일, 바람직하게는 3일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출할 수 있으나, 염증성 질환의 예방 또는 치료 활성이 있는 물질을 추출하는 방법이라면 제한없이 이용될 수 있다. 바람직하게는 냉침추출로 1회 내지 5회 연속 추출하여 감압여과하고, 그 여과추출물을 진공회전농축기로 20 내지 100℃, 바람직하게는 실온에서 감압 농축하여 물, 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 두메닥나무 조추출물을 수득한 결과물이 될 수 있으나, 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 치료 활성을 나타낼 수 있는 한, 이에 제한되지는 않고, 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물을 모두 포함한다. 상기 두메닥나무 추출물은 천연, 잡종, 변종식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어, 뿌리, 지상부, 줄기, 잎, 열매 또는 식물 조직 배양물 등으로부터 추출 가능하며, 바람직하게는 두메닥나무의 잎과 줄기로부터 추출될 수 있다.

[0013] 본 발명에서 용어, “분획물”은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 본 발명의 두메닥나무 분획물은 두메닥나무 추출물을 현탁한 후, 물, 메탄올, 에탄올 등의 극성 용매 또는 헥산, 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매를 사용하여 분획함으로써 극성 용매 분획물과 비극성 용매 분획물을 각각 수득할 수 있다. 구체적으로, 두메닥나무 조추출물을 증류수 등에 현탁한 후, 현탁액의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 물, 탄소수 1(C_1) 내지 4(C_4)의 알코올, 클로로포름, 에틸아세테이트, 헥산, 부탄올 또는 이들의 혼합용매와 같은 극성 또는 비극성 용매를 가하여 1회 내지 10회, 바람직하게는 2회 내지 5회에 걸쳐 극성 또는 비극성 용매 가용층을 추출, 분리하여 수득할 수 있다. 또한 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다(Harborne J.B. Plant Pathology, 1998, 3rd Ed. p6-7). 보다 구체적으로, 상기 두메닥나무 조추출물을 물에 현탁한 후, 물, 메탄올 또는 이의 혼합용매[10:90→100:0(v/v)]를 용매로 이용하여 연속 추출 후 두메닥나무 각 용매 가용 추출물을 수득할 수 있으며, 바람직하게는 60 내지 100%(v/v) 메탄올을 용매로 사용하여 수득할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다(제조예).

[0014] 본 발명에서 용어, “염증성 질환”은 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미로서, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 부종, 알레르기, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 간직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome) 및 다발성 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 해당할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명에서 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여로 염증성 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물에 의해 염증성 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0016] 본 발명의 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형체 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량%

내지 99 중량%로, 바람직하게는 0.01 중량% 내지 50 중량%를 포함할 수 있다.

[0017] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 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 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 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, 동결건조 제제, 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.

[0018] 본 발명의 일 실시예에서는 두메닥나무의 추출물 또는 이의 분획물이 세포독성이 없으면서(실시예 2), NO의 생성을 억제하고(실시예 3), 염증관련인자인 TNF-α의 생성을 억제함을 확인하였다(실시예 4). 특히, 9번 및 10번 분획물의 투여군에서 NO 및 TNF-α의 생성 억제활성이 현저히 높았음을 확인하였다.

[0019] 따라서, 본 발명의 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물은 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0020] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 염증성 질환의 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 상기 염증성 질환의 의심 개체는 상기 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물을 염증성 질환의 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 상기 약학적 조성물 및 염증성 질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0022] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 염증성 질환의 의심 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어, "약학적으로 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, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 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.

[0025] 본 발명의 약학적 조성물은 염증성 질환을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용 가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 인간, 조류 및 어류 등 어느 것이나 사용할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의하여 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 일반적으로 0.001 내

지 1000 ㎎/㎏의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 ㎎/㎏, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 ㎎/㎏의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0027] 또 다른 양태로서, 본 발명은 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0028] 상기 두메닥나무, 이의 추출물, 분획물 및 염증성 질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0029] 본 발명에서의 용어, "개선"은 두메닥나무 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 예방 또는 치료되는 염증성 질환과 같은 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0030] 구체적으로, 본 발명의 추출물 또는 이의 분획물을 염증성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 조성물에 첨가할 수 있다.

[0031] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함할 수 있으며, 본 발명의 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.

[0032] 상기 식품 조성물에는 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물 이외에도 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명에서 용어, "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0034] 상기 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류; 및 덱스트린, 시클로덱스트린 등의 다당류와, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 있으며, 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴 등), 스테비아 추출물(레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능성 식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "건강기능성 식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능성 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.

[0036] 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명의 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물은 원료 조성물 중 1 내지 50 중량%, 바람직하게는 5 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

[0037] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 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, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능성 식품을 모두 포함한다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물은 오랫동안 천연약재로 사용되어온 천연물에서 유래되어 부작용이 없으면서도, 염증관련 인자인 질소산화물(NO) 및 TNF-α의 생성을 억제하므로, 상기 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 치료에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 두메닥나무 잎, 줄기 메탄올 추출물을 MPLC(Medium pressure liquid chromatography)로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 두메닥나무 잎, 줄기 메탄올 추출물의 분획물(분획물 1 내지 13)을 UPLC(Ultraperformance Liquid Chromatography)를 사용하여 PDA(Photodiode-Array detection) 및 MS(Mass Spectrometry)로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 두메닥나무 잎, 줄기 메탄올 추출물의 분획물(분획물 1 내지 13)을 UV 및 CAD(Charged Aerosol Detector)로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 두메닥나무 잎, 줄기 메탄올 추출물의 분획물(분획물 1 내지 13)의 세포생존율을 나타낸 도이다.

도 5는 두메닥나무 잎, 줄기 메탄올 추출물의 분획물(분획물 1 내지 13)의 NO(nitric oxide) 생성저해율을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 본 발명을 하기 실시예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0041] **제조예: 두메닥나무 잎, 줄기의 추출물 및 분획물 제조**

[0042] 본 발명자들은 충북 제천시에서 채취하여 건조시킨 두메닥나무 잎 및 줄기 30 g을 건조기(50-55℃)를 사용하여 자연건조(음건)시켜 수분을 제거한 후 약 1 cm의 크기로 분쇄하였다. 분쇄된 분말시료의 건조 중량을 기준으로 메탄올 1 ℓ를 가한 후 상온에서 추출하였다. 그런 다음 여과 및 감압농축 후, 두메닥나무 잎 및 줄기의 메탄올 추출물 4.58 g을 수득하였다. 이후의 실험에서는 수득된 두메닥나무 잎, 줄기 메탄올 추출물을 총(total) 추출물로 명명하였다.

[0043] 또한, 상기 두메닥나무 추출물의 분획물을 제조하기 위해 MPLC(Medium pressure liquid chromatography) 기기(sepbox 2D 5000)에 칼럼(20 mm × 250 mm; Resin: Zeoprep C18, 10 ㎛)을 장착한 후 각각의 메탄올 추출물을 2 g의 양으로 로딩하였다. 이때, 용매로는 물/메탄올[10:90→100:0 (v/v)]를 사용하고, 용리 속도는 40 ㎖/분이었으며, UV 200-400 ㎚의 파장에서 검출하였다. 분석 시간은 150분으로 하여 하기 표 1에서와 같이 분획물 1 내지 13을 수득하였다(표 1, 도 1).

표 1

[0044]

두메닥나무	MeOH (%)	분석시간 (min)	무게 (mg)
분획물1	0-14	0-18	796.1
분획물2	14-22	18-27	105.2
분획물3	22-27	27-34	87.4
분획물4	27-32	34-40	162.2
분획물5	32-42	40-51	178.8
분획물6	42-48	51-58	112.2
분획물7	48-51	58-62	150.9
분획물8	51-60	62-72	121.8
분획물9	60-64	72-78	68.1
분획물10	64-70	78-84	115
분획물11	70-83	84-100	69.1

분획물12	83-89	100-107	60.8
분획물13	89-100	108-134	60.4

[0045] **실시예 1: 두메닥나무 잎, 줄기 추출물 및 분획물의 분석**

[0046] 상기 제조예에서 수득한 두메닥나무의 메탄올 추출물 및 활성 분획물의 활성분획을 조사하기 위하여 이들을 액체 크로마토그래피인 UPLC(ultra performance liquid chromatography)로 분석하였다.

[0047] 먼저, UPLC 분석을 위해 상기 제조예에서 수득한 두메닥나무 메탄올 추출물 및 활성 분획물을 UPLC용 0.25 ㎛ 멤브레인 필터로 1회 여과하였다. UPLC 기기(Waters UPLC-QTOF-MS)에 칼럼(Waters BEH C18 column, 2.1 × 100 mm, 1.7 ㎛)을 장착한 후 여과된 각각의 분획물을 5 ㎕ 양으로 로딩하였다. 이때, 용매로는 아세토니트릴 + 0.1% 포름산/물 + 0.1% 포름산 [10:90→100:0 (v/v)]을 사용하고, 용리 속도는 0.4 ㎖/분이었으며, PDA(Photodiode-Array detection), MS(Mass Spectrometry) 및 CAD(collision-activated decomposition)로 활성 분획물을 검출하였다(도 2 및 도 3).

[0048] **실시예 2: 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물이 세포생존율에 미치는 영향 분석**

[0049] 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물이 세포생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여, Raw264.7 세포를 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)을 5% 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 1 × 105 개/㎖의 농도로 현탁한 후, 100 ㎕씩 96-웰 플레이트에 접종하여 부착하였다. 4시간 후에 시료를 각각 50 ㎍/㎖의 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, 5 mg/㎖의 MTT 용액을 웰당 10 ㎕씩 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고, DMSO를 100 ㎕씩 첨가한 후, 570 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 DMSO를 0.2% 처리한 음성대조군의 값을 100%로 하여 하기 수학식 1에 따라 계산하였다.

[0050] [수학식 1]

[0051] $$\text{세포생존율}(\%) = \frac{\text{추출물등처리한 } OD_{570nm} \text{ 값}}{\text{음성대조군 } OD_{570nm} \text{ 값}} \times 100$$

[0052] 그 결과, 상기 제조예에서의 분획물 11(73.06±5.02%)과 분획물 13(73.98±8.63%)을 제외하고는 모두 90% 이상의 세포생존율을 나타내었으며, 이는 본 발명의 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물이 세포독성이 없음을 의미한다(도 4).

[0053] **실시예 3: 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물의 질소산화물(NO) 생성 억제 효과**

[0054] 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물의 염증 억제 효과를 알아보기 위하여, 생쥐의 대식세포인 Raw264.7 세포에서 리포폴리사카라이드(LPS)로 유도된 질소산화물(Nitric oxide; NO)의 생성 억제율을 측정하였다.

[0055] 구체적으로, 페놀레드(phenol-Red) 무함유 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco사) 배지에 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)을 5% 첨가하고, 세포를 2.5 × 10^5 개/㎖농도로 현탁한 후, 96-웰 플레이트 (96-well plate)에 200 ㎕씩 접종하였다. 4시간 동안 세포 부착을 유도한 후, 시료를 각각 50 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 1시간 동안 배양하였고, 이어서 0.5 ㎍/㎖의 LPS를 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, 상층액 100 ㎕를 회수하여 새로운 96-웰 플레이트에 분주하고, 그리스 시약(Griess reagent, Sigma사)을 동량 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 측정기(microplate reader, Bio-Rad사)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 아질산나트륨(sodium nitrite)을 이용하여 검량선을 작성하고, 이를 기준으로 배양액 내 질소산화물의 생성량을 계산하였으며, LPS를 처리한 군의 질소산화물의 생성량을 100%로 하여 각 시료의 저해율을 계산하였다.

[0056] 그 결과, LPS만 처리한 세포에서는 질소산화물(NO)의 생성량이 급격히 증가한 반면, 두메닥나무의 추출물 또는 이의 분획물을 전처리한 후 LPS를 처리한 세포에서는 질소산화물(NO)의 생성량이 감소하는 것을 확인하였다(도 5). 특히, 상기 제조예에서의 분획물 9 내지 13에서는 40% 이상의 NO생성 저해율을 나타내었음을 확인하였다.

[0057] **실시예 4: 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물의 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor-alpha, TNF-α) 생성 억제 효과**

[0058] 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물이 TNF-α의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 TNF-α ELISA kit을 사용하여 상기 실시예 3과 같이 처리된 세포상등액에서의 TNF-α의 양을 확인하였다. 상기 실시예의 결과에서 효과가 있는 분획물이라 판단되는 상기 제조예의 두메닥나무의 분획물 9 내지 13 및 두메닥나무의 추출물(Total)의 NO 생성저해율 및 TNF-α 생성저해율을 비교하였다.

[0059] 그 결과, 하기 표 2에서 나타난 바와 같이, 두메닥나무의 추출물(Total)이 30% 이상의 NO 및 TNF-α의 생성저해율을 가짐을 확인하였으며, 이의 분획물 9 내지 분획물 13은 이보다 더 높은 NO 및 TNF-α의 생성저해율을 가짐을 확인하였다. 특히 분획물 9 및 분획물 10에서 가장 높은 생성저해율을 가짐을 확인하였다.

표 2

[0060]

시료 (50㎍/㎖)	NO 억제율 (%, Ave±SD)	TNF-α억제율 (%, Ave±SD)
DMSO +LPS처리군	0.00 ± 3.19	0.00 ± 11.29
두메닥 추출물(Total) +LPS처리군	30.83 ± 0.43	32.40 ± 1.52
두메닥 분획물(9번)+LPS처리군	85.26 ± 1.70	70.83 ± 1.42
두메닥 분획물(10번)+LPS처리군	88.12 ± 4.04	80.69 ± 2.66
두메닥 분획물(11번)+LPS처리군	59.25 ± 3.19	49.44 ± 0.76
두메닥 분획물(12번)+LPS처리군	51.43 ± 2.76	38.37 ± 2.18
두메닥 분획물(13번)+LPS처리군	50.83 ± 0.21	32.47 ± 3.32

[0061] 이상의 결과를 통해 본 발명에 따른 두메닥나무 추출물 또는 이의 분획물이 염증성 질환의 예방, 치료 또는 개선에 효과적임을 확인하였다.

[0062] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063]

[0064] **제제예 1: 약학적 제제의 제조**

[0065] 본 발명의 두메닥나무 추출물 또는 분획물을 포함하는 약학적 제제는 다음과 같이 통상적인 방법에 따라 제조하였다.

[0066]

[0067] **제제예 1-1: 산제의 제조**

[0068] 제조예에서 각각 제조한 두메닥나무 추출물 및 분획물 2 g

[0069] 유당 1 g

[0070] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0071]

[0072] **제제예 1-2: 정제의 제조**

[0073] 제조예에서 각각 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물 100 mg

[0074] 옥수수전분 100 mg

[0075] 유당 100 mg

[0076] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0077] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0078]

[0079] **제제예 1-3: 캡슐제의 제조**

[0080] 제조예에서 각각 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물 100 ㎎

[0081] 옥수수전분 100 ㎎

[0082] 유당 100 ㎎

[0083] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[0084] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0085]

[0086] **제제예 1-4: 환의 제조**

[0087] 제조예에서 각각 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물 1 g

[0088] 유당 1.5 g

[0089] 글리세린 1 g

[0090] 자일리톨 0.5 g

[0091] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0092]

[0093] **제제예 1-5: 과립의 제조**

[0094] 제조예에서 각각 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물 150 ㎎

[0095] 대두 추출물 50 ㎎

[0096] 포도당 200 ㎎

[0097] 전분 600 ㎎

[0098] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 ㎎을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0099]

[0100] **제제예 2: 건강기능성 식품의 제조**

[0101] 본 발명의 두메닥나무 추출물 또는 분획물을 포함하는 건강기능성 식품들을 다음과 같이 통상적인 방법에 따라 제조하였다.

[0102]

[0103] **제제예 2-1: 밀가루 식품의 제조**

[0104] 본 발명의 제조예에서 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물 0.5 ~ 5.0 중량을 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0105]

[0106] **제제예 2-2: 유제품(dairy products)의 제조**

[0107] 본 발명의 제조예에서 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물 5 ~ 10 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0108] **제제예 2-3: 선식의 제조**

[0109] 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. 본 발명의 제조예에서 각각 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물을 진공 농축기에서

감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0110] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 두메닥나무 추출물 또는 분획물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0111] 곡물류 (현미 30 중량%, 율무 15 중량%, 보리 20 중량%),

[0112] 종실류 (들깨 7 중량%, 검정콩 8 중량%, 검정깨 7 중량%),

[0113] 두메닥나무 추출물 또는 분획물의 건조분말 (3 중량%),

[0114] 영지 (0.5 중량%),

[0115] 지황 (0.5 중량%)

[0116]

[0117] **제제예 3: 음료의 제조**

[0118] **제제예 3-1: 건강음료의 제조**

[0119] 제조예에서 각각 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물 1000 ㎎

[0120] 구연산 1000 ㎎

[0121] 올리고당 100 g

[0122] 매실 농축액 2 g

[0123] 타우린 1 g

[0124] 정제수를 가하여 전체 900 ㎖

[0125] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0126] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0127]

[0128] **제제예 3-2: 야채 주스의 제조**

[0129] 본 발명의 제조예에서 각각 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 야채 주스를 제조하였다.

[0130]

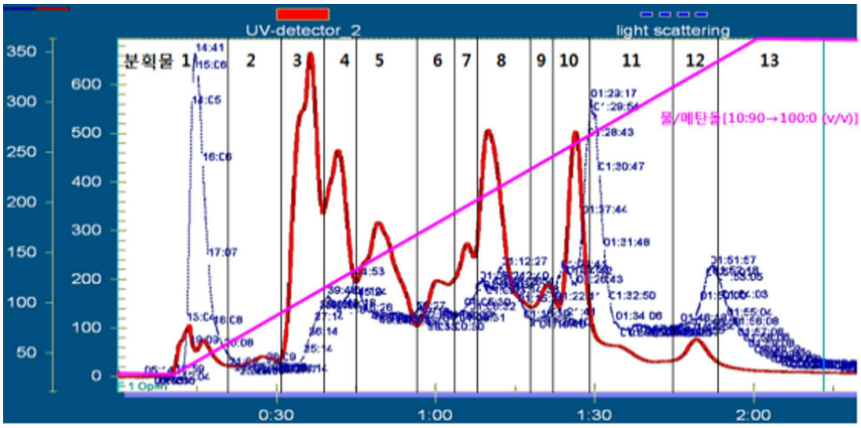
[0131] **제제예 3-3: 과일 주스의 제조**

[0132] 본 발명의 제조예에서 각각 제조한 두메닥나무 추출물 또는 분획물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 과일 주스를 제조하였다.

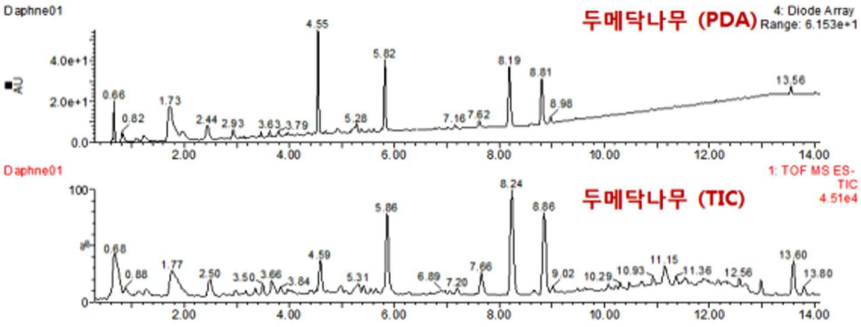
[0133] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

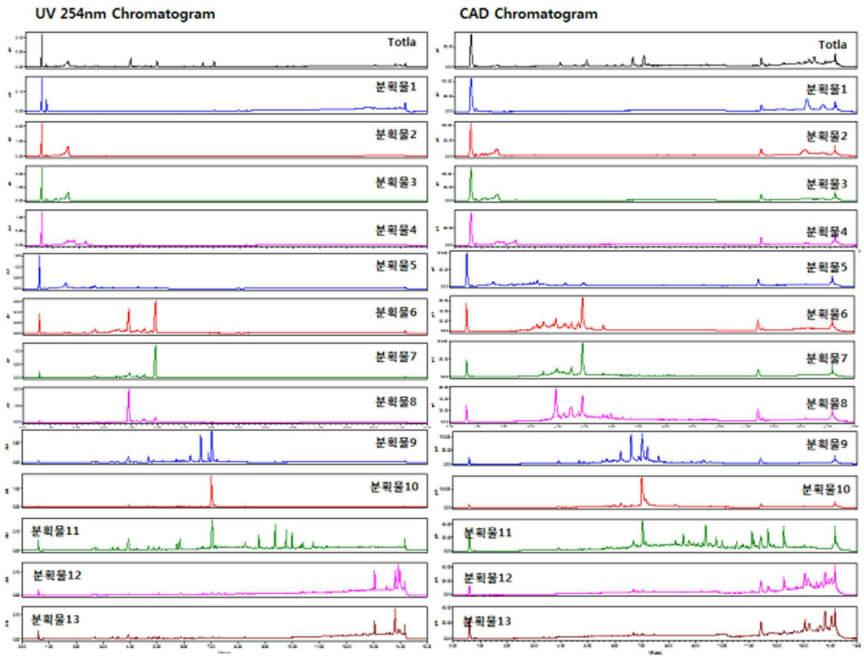
도면1



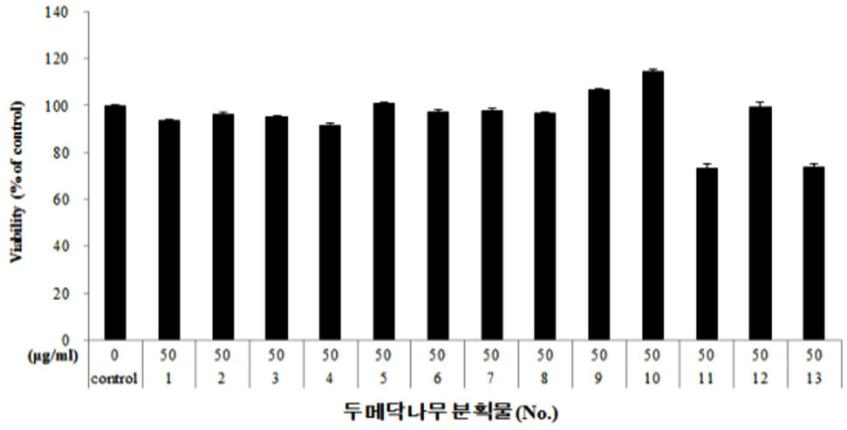
도면2



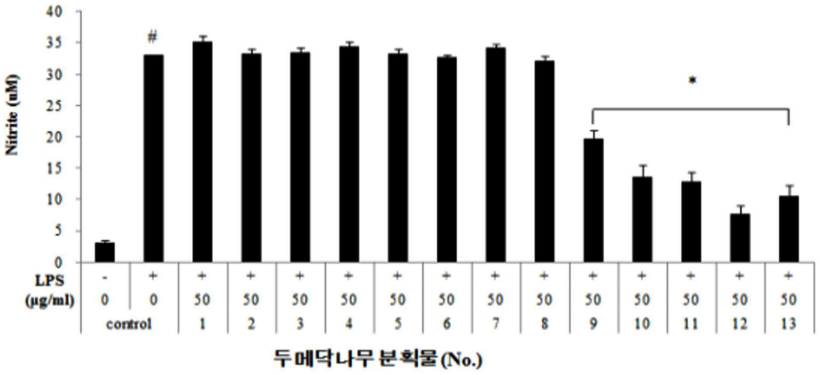
도면3



도면4


Viability (% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
(μg/ml)
0 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50
control 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
두메닥나무 분획물 (No.)

도면5


Nitrite (nM)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
#
*
LPS
(μg/ml)
- + + + + + + + + + + + + + +
0 0 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50
control 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
두메닥나무 분획물 (No.)