



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년07월18일
A61K 36/70 (2006.01)	(11) 등록번호	10-0740716
A61P 7/02 (2006.01)	(24) 등록일자	2007년07월11일

(21) 출원번호	10-2005-0097886	(65) 공개번호	10-2007-0042238
(22) 출원일자	2005년10월18일	(43) 공개일자	2007년04월23일
심사청구일자	2005년10월18일		

(73) 특허권자 안동대학교 산학협력단
 경북 안동시 송천동 안동대학교

(72) 발명자 손호용
 경북 안동시 송현동 우성아파트 101동 801호

 권정숙
 경북 안동시 정하동 300-1 화성드림파크아파트 108동 1202호

 류희영
 경북 봉화군 법전면 소천1리 110-3번지

(74) 대리인 이덕록

(56) 선행기술조사문헌
 생약학회지 35(1), 52-61 (2004)

심사관 : 여호섭

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 메밀 추출물을 함유하는 트롬빈 저해 혈전증 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 메밀(*Fagopyrum esculentum* Moench) 종자 추출물을 함유하는 트롬빈 저해 혈전증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 메밀 종자 추출물 및 조정제물은 물, 주정, 메탄올, 부탄올 등의 다양한 용매로 추출하고, 그 추출물을 순차적 유기용매 분획하여 획득할 수 있으며, 추출물 및 조정제물은 우수한 트롬빈 저해활성을 나타내어, 혈전 생성을 효율적으로 억제할 수 있으며, 혈행개선을 통해 허혈성 뇌졸중 및 출혈성 뇌졸중과 같은 혈전증의 예방 및 치료용으로 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 메밀 종자 추출물은 급성경구독성 및 만성독성이 나타나지 않으며, 동물실험에서도 기존 항혈전제인 아스피린보다 우수한 활성을 나타내었으며, 열 안정성이 우수하고, pH 2의 산성조건에서 60분 처리시 50% 이상의 활성을 유지하여, 추출액, 분말, 환, 정 등의 다양한 형태로 가공되어 상시 복용 가능한 형태로 조제할 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

메틸 종자의 주정 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

메틸 종자 주정 추출물의 부탄올 분획물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 4.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 메틸 종자 추출물을 함유하는 트롬빈 저해 혈전증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 메틸 종자를 물, 메탄올, 주정, 부탄올 등의 다양한 용매로 추출한 후, 순차적 유기용매 분획을 통해 얻어지는 폴리페놀성 화합물의 항혈전 성분에 관한 것으로, 경구급성독성과 만성독성이 나타나지 않으면서 종래의 혈전생성 억제제와 달리 우수한 항혈전 활성을 나타내고, 열 안정성이 우수하여 다양한 형태로 가공되어 경구투여 할 수 있는 메틸의 생리활성성분에 관한 것이다.

생체 구성성분으로 혈액은 산소, 영양분, 노폐물의 운반 기능과 완충작용, 체온유지, 삼투압 조절 및 이온 평형유지, 수분 일정유지, 액성 조절작용, 혈압의 유지 및 조절, 생체방어 등 다양한 중요 기능이 있다. 따라서 혈액의 기능적 이상은 다양한 질병을 유발하게 되며, 특히, 손상된 혈관 내에서 혈액 손실을 최소화하기 위한 지혈기능의 이상으로 유래 되는 뇌혈관 질환이나 심장질환은 생명에 치명적이며 후유증 또한 심각하다. 현재, 심혈관계 질환의 경우, 사회의 발달과 인구의 고령화에 따라 급속히 증가하고 있으며, 그 사망률의 합계는 악성종양의 경우를 상회하고 있어 치료제 개발이 매우 시급한 실정이다.

정상적인 혈액 순환은 체내에서의 혈액 응고 반응계와 혈전 용해 반응계가 상호보완적으로 조절되면서 혈액 순환을 용이하게 하며, 이들 중 혈액 응고 반응계의 기작은 혈관벽에 혈소판이 점착, 응집하여 혈소판 혈전을 형성한 후, 혈액 응고계가 활성화되어 혈소판 응집괴를 중심으로 피브린 혈전이 형성되는 것으로 보고되어 있다. 피브린 혈전의 생성은 수많은 인자의 여러 단계반응을 거쳐 피브린 응고에 직접 관여하는 트롬빈이 활성화되어, 최종적으로 피브리노겐으로부터 피브린 단량체를 생성하게 하며, 피브린 단량체들은 칼슘에 의해 중합되어, 혈소판과 내피세포에 결합하게 되며 Factor XIII에 의해 교차 결합한 피브린 폴리머를 형성하면서 영구적인 혈전을 생성하게 된다. 또한, 트롬빈은 혈소판, V 인자, VII 인자들을 활성화시켜 혈액 응고반응을 촉진하는 등 혈전 생성에 중추적 역할을 하게 된다. 따라서, 트롬빈의 활성 저해물질은 과다한 혈액응고 이상으로 발생하는 다양한 혈전성 질환에 매우 유용한 예방 및 치료제로 사용될 수 있어 전 세계적으로 트롬빈 직접저해제 개발을 목표로 하고 있다. 현재까지 혈전성 질환의 예방과 치료에 헤파린, 쿠마린, 아스피린, 유로키네이스 등의 다양한 항응고제, 항혈소판제, 혈전용해제 등이 사용되고 있으나, 이들은 가격이 매우 높을 뿐 아니라 출혈성 부작용과 위장장해 및 과민반응 등으로 그 사용이 한정되고 있는 실정이다.

한편, 메밀은 마디풀과에 속하는 일년초로서 원산지는 동아시아의 북부 아무르강에서 만주 바아칼호 지역에 걸쳐 재배되고 있는 곡물이다. 우리나라에서는 가뭄이 심해 벼농사가 불가할 때 재배하는 구황식물로서 이용되었으며, 생육기간이 짧고, 척박한 땅에서도 잘 자라며, 과거로부터 오방지역물이라 하여 식물이상의 의미를 부여받아왔다. 메밀은 전통적으로 홍역, 궤양성 위장병 등 내과적 치료용과 타박상, 악성종기 등 외과적 치료용으로 사용되어 왔으며, 기력을 도와주며, 독소를 해독시키며 노폐물을 제거하는 생리적 기능이 보고되어 있다(한국식품영양과학회지, 26: 411-416, 1997). 또한 메밀은 혈압강화 효능을 가진 루틴을 많이 함유하여, 동맥경화증, 폐출혈, 궤양성 질환, 동상, 치질, 감기치료 등에 그 효과가 인정되어 임상적으로 이용되고 있다. 메밀 추출물의 생리활성에 대한 연구로는, 70% 에탄올로 추출한 메밀 추출물의 발암억제 효과(최영희 외, 한국식품과학회지 30: 964-969, 1998), 물 추출물의 항산화 효과 및 엔지오텐신 전환효소 저해 활성(김동희 외, 한국식품영양과학회. 16: 347-352, 2003; 서형주 외, 한국식품영양과학회지, 26: 411-416, 1997), 혈압조절효능(한국영양식량학회지, 20: 300-305, 1991), 당뇨병 치료효능, 항돌연변이 효능, 신장개선에 대한 효능, 항염증 효능(특허등록번호 제 60247호), 간암 억제 효능(특허등록번호 제 441565호), 골다공증 예방 및 치료효과(특허등록번호 제 0101621호, 2004.12.03), 피부 알레르기 완화 효능(특허등록번호 제 68969호) 등이 보고되어 있다. 그러나 항혈전활성 및 인간 트롬빈 효소의 저해를 통한 혈전생성저해 효과는 보고된 바 없었다.

이에 본 발명자들은 항혈전 및 혈류개선 활성을 나타내는 기능성 식품 개발을 목표로, 다양한 식용, 약용식물의 추출물을 조제한 후, 인간 혈장과 인간 트롬빈을 이용하여 추출물 각각에 대한 트롬빈 직접저해에 따른 혈전생성 저해활성을 평가하였다. 이러한 연구 중, 메밀 종자 추출물에서 강력한 항혈전 활성 및 인간 트롬빈 저해활성을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 메밀 종자로부터 물 또는 유기용매로 트롬빈 저해활성물질을 추출하여 분리 정제하고, 이를 유효성분으로 하는 혈전생성 저해제를 제공하고자 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 상기 목적은 메밀 종자로부터 트롬빈 저해활성물질의 최적 추출용매와 추출조건을 결정하고, 추출물의 순차적 유기용매 분획을 통해 활성성분을 조정제하고, 상기 물질의 화학적 특성 및 안정성을 조사하고, 상기 물질을 흰쥐에 경구 투여하여 급성 및 만성독성검사, 생체내에서의 항혈전 활성, 허혈성 질환에 의한 혼수 방지 활성 및 치사억제 활성을 실시함으로써 달성하였다.

이하, 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

발명의 구성

본 발명은 메밀 종자로부터 트롬빈 저해활성물질의 최적 추출용매와 추출조건 결정단계; 메밀 종자 추출물의 순차적 유기용매 분획을 통해 활성성분의 조정제단계; 상기 물질의 화학적 특성 및 안정성 조사단계; 및, 상기 물질의 급성 및 만성독성검사단계; 상기 물질의 혈전성 마비 억제, 허혈성 질환에 의한 혼수방지 및 치사억제 활성 검사단계로 구성된다.

본 발명의 구성물에 포함되는 "메밀 종자 추출물"은 메밀의 종자를 도정하지 않은 메밀 껍질을 포함하거나, 도정한 알곡, 종자의 분말로부터 추출하여 얻은 것을 의미하고, 바람직하게는 성숙한 종자의 도정한 알곡으로부터 얻은 추출물을 의미한다.

본 발명의 트롬빈 활성저해물질을 함유하는 메밀 종자는 국내에서 건강식품으로 인식되어, 다양한 원인과 복합적 인자에 의해 발병하는 만성 대사성 질환에 효능이 있다고 알려져 관심이 집중되고 있는 식용식물 종자로, 원료 안전성 및 안정된 공급이 확보되어 있다.

본 발명의 실시예에 따르면, 메밀 종자의 메탄올 추출물의 트롬빈 저해활성을 다양한 농도에서 측정한 결과, 항혈전제로 사용되고 있는 아스피린보다 2.1배 이상의 강력한 트롬빈 저해활성을 확인하였다. 또한 이러한 저해활성은, 메밀의 주요 생리활성성분으로 기존에 보고된, 루틴이나 페룰릭산에 의해 나타나는 것이 아님을 확인하였다. 비록 루틴 및 페룰릭산이 혈관 투과성 증대, 항산화 활성, 항균 활성 및 항혈전 효과가 보고되어 있으나, 이들은 아스피린의 50% 정도의 트롬빈 저해 및 항혈전 효과를 나타내었다. 이러한 결과는, 메밀 종자 추출물이 효율적으로 기존의 아스피린과 같은 항응고제를 대체할 수 있음을 나타낸다.

본 발명의 실시예에 따르면, "메밀 종자 추출물"은 다양한 추출용매를 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 물(냉수, 열수), 주정, 탄소수 1~4의 무수 또는 함수 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 주정, 프로판올, 부탄올 등), 상기 저급알코올과 물과의

혼합용매 등을 이용하며, "메밀 종자 추출물"을 제조할 수 있다. 바람직하게는 메탄올 또는 주정을 사용하여 추출하는 경우 최대의 활성물질의 수율을 나타낸다. 본 발명의 메밀 종자 추출물은 감압증류 및 동결건조, 또는 분무건조 등과 같은 통상적인 분말화 과정을 거쳐 분말로 제조될 수 있다.

주정, 물, 메탄올, 에탄올 등 상기 추출용매를 사용하여 조제된 메밀 종자 추출물은 물에 현탁 후, 핵센, 에틸아세테이트 및 부탄올을 이용하여 순차적으로 분획하고, 잔류되는 물 분획으로 나눌 수 있으며, 이 경우 활성물질은 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에서 대부분 검출된다. 에틸아세테이트 및 부탄올 분획은 다시 감압증류 및 동결건조, 또는 분무건조 등과 같은 통상적인 분말화 과정을 거쳐 분말로 제조될 수 있다. 준비된 활성 에틸아세테이트 및 부탄올 분획층은 닌히디린 반응에는 음성, 안트론 반응에는 양성을 나타내었고, 상당량의 폴리페놀성 성분을 함유하고 있는 것을 알 수 있다. 이들은 우수한 열안정성을 가지며, pH 2(인체 위내의 pH) 조건하에서 1시간 처리시에도 50% 이상의 활성을 유지한다.

식용으로 사용되고 있는 메밀 종자의 추출물 및 이의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물의 급성 및 만성독성을 검사한 결과, 1,000mg/kg의 고농도 경구투여와 10mg/kg의 농도로 3주간 투여한 경우에도 병적 이상 징후나 장기 출혈이 나타나지 않아 안전성이 우수함을 확인하였다. 또한 콜라겐과 에피네프린을 주사한 폐색전 실험 및 청산가리 주사에 의한 혼수유발 실험, 고농도 청산가리 주사에 의한 허혈성 치사유발실험에서도 우수한 활성을 나타내어, 혈전 생성 억제, 혼수 억제, 치사 억제 효과를 확인하였다.

이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1: 메밀 종자 추출물의 조제와 추출물의 항혈전 효과 검색

본 발명에 사용된 메밀은 강원도 평창군에서 재배되어 봉평농협에서 제공받은 것으로 메밀껍질의 도정 후, 정선된 것으로, A.O.A.C법에 따른 일반성분 분석결과, 수분 12%, 회분 1.7%, 조단백질 9.5%, 조섬유 2.5%, 조지방 0.02%로 나타났다. 이를 그늘에서 충분히 건조하여 수분함량이 1.2%가 된 후, 메탄올을 사용하여 상온에서 24시간 추출하였으며, 추출액은 감압 농축하여 분말로 제조하였으며, 수율은 1.85%~2.30%로 평균 2.1%를 나타내었다. 조제된 분말은 사용 전까지 저온 밀봉 보관하였으며, DMSO에 녹인 후 적당한 농도로 희석하여, 인간 혈장을 이용한 인간 트롬빈 저해 활성을 측정하였다.

트롬빈의 저해활성은 기존에 보고된 방법에 준해 평가하였으며(Sohn *et al.*, 2004. *Kor. J. Pharmacogn* 35. 52-61; Kwon *et al.*, 2004. *J. Life Science*, 14. 509-513), 트롬빈 타임(thrombin time)을 측정하였다. 혈장은 지원자의 전혈로부터 조제하였으며, 채혈 후 즉시 4℃에서 5,000g로 5분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 냉동한 상태로 보관하였으며(신선동결혈장), 필요할 때 상온에서 해동하여 사용하였다. 트롬빈 타임의 측정법은 다음과 같다:

37℃에서 0.5U 트롬빈(Sigma Co., USA) 50 μ l와 20 mM CaCl₂ 50 μ l, 다양한 농도의 시료 추출액 10 μ l를 Amelung coagulometer KC-1A(Japan)의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100 μ l를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다. 대조구로는 아스피린(Sigma Co., USA)과 헤파린(heparin; Sigma Co., USA)을 사용하였으며, 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용하였다. DMSO의 경우 32.1 초의 응고시간을 나타내었다. 열 안정성 측정의 경우에는 다양한 농도의 시료용액을 100℃에서 30분간 열처리하고, 실온에서 1시간 방냉한 후, 잔존활성을 측정하였다. 트롬빈 저해 효과는 3회 이상 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 시료 첨가시의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값에 100을 곱하여 %로 나타내었다.

표 1에 나타난 바와 같이, 메밀 종자의 메탄올 추출물은 1,250 μ g/mL 농도에서 614.2 $\pm$ 21.11%의 트롬빈 저해활성을 나타내었다. 대조구로 사용된 항응고제인 아스피린은 동일농도에서 287.5 $\pm$ 45.4%의 저해활성을 나타내었다. 또한 메밀의 주요 생리활성물질인 루틴과 페룰릭산은 동일농도에서 137~138%의 저해활성을 나타내었다. 이러한 결과는 메밀 종자 추출물내의 항혈전 효과는 루틴, 또는 페룰릭산에 의해 나타나는 것이 아님을 알 수 있게 하며, 메밀 종자 추출물이 아스피린을 대체할 수 있음을 제시한다.

한편 메밀 종자를 물에 담가 발아시킨 발아메밀의 메탄올 추출물을 대상으로 항혈전 활성을 측정한 결과 트롬빈 저해활성은 1,250 μ g/mL 및 2,500 μ g/mL 농도에서 113.2 $\pm$ 7.1%의 활성을 나타내어 종자 발아 시 활성물질이 소실됨을 확인하였다.

[표 1]
메밀 종자의 메탄올 추출물과 아스피린, 루틴, 페룰릭산의 항혈전 활성

최종 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	트롬빈 저해활성 (%)			
	메밀 메탄올 추출물	아스피린	루틴	페룰릭산
0	100.0 ± 1.1	100.0 ± 1.1	100.0 ± 1.1	100.0 ± 1.1
315	102.7 ± 4.1	112.5 ± 4.1	108.6 ± 8.1	105.9 ± 9.5
625	126.8 ± 15.5	149.2 ± 17.8	120.1 ± 21.5	107.8 ± 11.2
1,250	614.2 ± 21.1	287.5 ± 45.4	137.6 ± 3.5	138.4 ± 11.2

실시예 2: 본 발명의 메밀 종자 항혈전 성분의 추출용매 선정 및 추출효율, 항혈전 활성 검토

메밀 종자의 항혈전 활성성분의 효율적인 추출을 위해, 건조된 40g의 메밀종자를 헥센, 메탄올, 주정 및 물 등의 다양한 용매를 이용하여 추출을 시도하였으며, 물의 경우에는 30℃ 및 100℃에서 추출하였다. 추출시간은 유기용매의 경우 20시간, 120℃ 물 추출의 경우에는 1시간을 추출하였다. 표 2 및 표 3에서 각각의 용매에 대한 추출효율과 추출물의 항혈전활성을 트롬빈 타임을 측정하여 나타내었다.

그 결과 메탄올 또는 주정을 이용한 추출이 효율적임을 확인하였으며, 수율면에서 메탄올 추출이 가장 효과적임을 확인하였으나, 추출물질의 활성은 주정에서 가장 우수하였다. 주정 및 메탄올 추출물의 경우, 의약품으로 사용되는 헤파린에 비하여는 항혈전 활성이 약하였으나, 아스피린에 비하여는 각각 4.6배, 2.4배 이상의 강한 활성을 나타내었다. 이에 대한 농도별 활성변화는 도 1에 상세히 나타내었다.

[표 2]
다양한 용매를 사용한 메밀종자 항혈전성분의 추출효율

추출용매	헥센	메탄올	주정	물(30℃)	물(100℃)
추출효율 (%)	0.64	2.15	0.64	2.46	6.95

[표 3]
다양한 용매를 이용하여 추출한 메밀 종자 추출물의 항혈전 활성의 비교

최종 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	헤파린	아스피린	메밀 추출물				
			헥센	메탄올	주정	물(30℃)	열수(100℃)
0	100.0 ± 1.1	100.0 ± 1.1	100.0 ± 1.1	100.0 ± 1.1	100.0 ± 1.1	100.0 ± 1.1	100.0 ± 1.1
1.0	125.4 ± 31.2	-	-				
1.5	> 2,000	-	-				
2.0	> 2,000	-	-				
500	> 2,000	136.7 ± 16.3	110 ± 4.3	147.6 ± 35.2	258.4 ± 40.8	121.7 ± 5.5	107.2 ± 2.9
1,250	> 2,000	287.5 ± 45.4	130.8 ± 3.6	696.5 ± 215.2	$1,328.4 \pm 294.4$	156.5 ± 9.5	128.7 ± 1.9

실시예 3: 본 발명의 메틸 종자 메탄올 추출물의 순차적 유기용매 활성분획 및 분획물의 활성 측정

실시예 2에서 언급한 방법을 사용하여 얻어진 메탄올 추출물 100g을 증류수에 현탁시킨 후 헥센, 에틸아세테이트, 부탄올의 순으로 순차적 유기용매 분획을 하였다. 그 결과 헥센 분획물 31.26g, 에틸아세테이트 분획물 5.19g, 부탄올 분획물 17.16g을 얻었으며, 물 잔류물 42.43g을 회수하였다.

각각의 분획물의 항혈전 활성은 표 4에 나타난 것과 같이 대부분의 활성은 부탄올 분획에서 나타났으며, 일부는 에틸아세테이트 분획에서도 확인되었다.

각각의 분획물의 총 플라보노이드 함량 및 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 표 5에 나타내었으며, 부탄올 분획물의 77%가 폴리페놀 성분으로 나타나 항혈전 활성의 주성분이 폴리페놀성 화합물로 추측된다. 실제 천연물 유래의 폴리페놀 성분은 강력한 항산화력을 나타내는 데, 본 발명의 부탄올 분획물은 토코페놀, 비타민 C, 부틸히드록시톨루엔 등 현재 사용되는 항산화제보다 강력한 항산화력을 나타내었으며, 0.05mg/mL 농도에서 96~99%의 자유 라디칼 소거능을 나타내었다. 또한 강력한 트롬빈 저해 활성을 나타내는 에틸아세테이트 분획과 부탄올 분획은 닌히드린 반응에는 음성, 안트론 반응에는 양성을 나타내어 비단백질 성분으로 확인하였다.

【표 4】

메틸 종자 메탄올 추출물의 순차적 유기용매 분획에 따른 분획물의 항혈전 활성의 비교

최종 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	분획물의 트롬빈 저해활성 (%)			
	헥센	에틸아세테이트	부탄올	물 잔류
0	100.0 $\pm$ 1.1	100.0 $\pm$ 1.1	100.0 $\pm$ 1.1	100.0 $\pm$ 1.1
315	118.2 $\pm$ 5.9	186.4 $\pm$ 5.96	145.3 $\pm$ 5.4	96.4 $\pm$ 6.9
625	164.5 $\pm$ 15.9	322.6 $\pm$ 6.9	453.7 $\pm$ 150.8	105.6 $\pm$ 4.5
1,250	196.5 $\pm$ 6.1	1,058.6 $\pm$ 274.5	> 2,000	110.4 $\pm$ 6.8

【표 5】

메틸 종자 메탄올 추출물의 순차적 유기용매 분획에 따른 분획물의 분획 수율 및 총 플라보노이드, 총 폴리페놀 함량의 비교

분획용매	헥센	에틸아세테이트	부탄올	물 잔류
분획수율 (%)	31.26	8.8	17.16	42.78
총 플라보노이드함량 (%)	13.56	5.08	18.59	12.75
총 폴리페놀 함량 (%)	60.88	17.89	77.41	62.91

실시예 4: 실시예 3의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획에 대한 산 안정성 및 열 안정성 측정

메틸 종자 추출물의 활성분획인 에틸아세테이트 분획과 부탄올 분획에 대한 산 안정성 및 열 안정성을 검토하였다. 먼저 산 안정성의 경우 DMSO에 녹인 시료를 pH2, 염산용액에 60분간 방치하고, 이를 0.5N 수산화나트륨 용액으로 중화하여 pH 7로 조정 후 잔존활성을 측정하였다. 열 안정성의 경우에는 DMSO에 녹인 시료를 100℃의 끓는 물에 10분간 열처리 한 후, 40℃에서 30분간 방치하여 방냉한 후, 37℃에서 잔존활성을 측정하였다. 잔존활성은 초기 측정된 활성과 처리 후의 활성의 비로 표시하였으며, 100%인 경우 활성감소가 전혀 없음을 나타낸다.

표 6에 나타난 바와 같이, 아스피린의 경우 산이나 열 처리에 매우 강한 안정성을 나타내었으며, 실제 열처리에 의해서는 활성이 초기에 비해 130% 정도 증가함을 알 수 있었다. 본 발명의 활성분획의 경우, 산 처리에 의해서는 46~57%의 활성을 유지하였으며, 열 처리에 의해서는 72~94%의 활성을 유지하여, 상당한 내산성과 우수한 내열성을 나타내어 다양한 식품제조공정에 사용가능함을 확인하였다.

[표 6]

실시에 3의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획의 산 및 열 안정성과 대조구로 사용된 아스피린의 산 및 열 안정성

시료/농도	트롬빈 저해 활성 (%)					
	산 안정성			열 안정성		
	무처리	pH2, 60분 처리	잔존활성 (%)	무처리	100℃, 10분 처리	잔존활성 (%)
아스피린 (15,000 µg/mL)	230.8± 10.2	244.2± 28.1	105.5± 10.6	230.8± 10.2	303.5± 5.4	135.1± 4.9
에틸아세테이트분획 (625 µg/mL)	322.7± 10.8	150.4± 16.6	46.5± 5.7	322.7± 10.8	305.8± 13.2	94.7± 1.3
부탄올 분획 (625 µg/mL)	453.7± 150.8	238.1± 21.3	57.2± 20.2	453.7± 150.8	298.9± 16.4	72.7± 29.1

실시에 5: 메밀 종자 추출물의 대량 제조와 유기용매 분획

동물실험 및 임상효능 실험을 위해, 본 발명의 메밀 종자 추출물은 다음과 같이 대량 제조하였다. 먼저 도정 후 정선된 메밀 종자를 정제수로 세척한 다음 건조하여, 메밀종자 70kg을 주정 400L에 넣고, 60℃에서 40시간 추출한 다음, 다시 주정 200L를 가해 동일조건에서 2차 추출한 다음 여과하였다. 추출액은 여과지(Adventec. No.2)로 여과한 후, 여과 추출액은 회전감압증발기(Rotavapor R-220, BUCHI)로 시간당 5L씩 농축하고, 다시 50℃, 650mmHg의 감압하에서 3일간 진공 건조시켜 메밀 종자 추출물 분말 930g을 수득하였다. 수득한 분말은 증류수에 현탁한 후, 이를 헥센, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차적 분획하고 이후 물 분획물을 회수하였다. 분획물 및 물 잔류물은 상기의 방법으로 분말을 조제하고, 조제 분말은 DMSO에 적당한 농도로 녹인 후, 트롬빈저해활성을 평가하였다. 주정 추출물에 대해, 헥센 분획은 61.6%, 에틸아세테이트 분획은 16.3%, 부탄올 분획은 7.3%, 물 잔류물은 14.8%를 차지하였다. 각 분획의 항혈전 활성은 표 7에 나타내었다. 대조구로는 항응고제인 아스피린을 사용하였다. 메탄올 추출물의 분획과 동일하게 부탄올 분획에서 가장 강력한 저해 활성을 확인하였다.

[표 7]

대량조제된 메밀 종자 주정 추출물과 순차적 유기용매 분획물의 항혈전 활성 비교

최종 농도 (µg/mL)	아스피린	메밀 추출물 및 분획물				
		주정 추출물	헥센 분획물	에틸아세테이트 분획물	부탄올 분획물	물 잔류물
0	100.0± 1.1	100.0± 1.1	100.0± 1.1	100.0± 1.1	100.0± 1.1	100.0± 1.1
312	-	-	-	100.1± 1.8	122.4± 5.2	-
625	-	117.2± 13.5	126.4± 5.5	338.9± 9.4	1106.2± 16.8	-
1,250	-	310.3± 22.6	147.5± 3.4	804.8± 27.3	> 2,000	128.7± 1.9
2,500	-	1,190± 356	-	-	-	141.4± 5.5

실시예 6: 메밀 종자 주정 추출물 및 부탄올 분획물의 급성 및 만성 독성 시험

식용으로 사용되고 있는 메밀 종자의 안전성을 확인하기 위해 메밀 종자 주정 추출물 및 이의 부탄올 분획물의 급성 및 만성 독성을 검사하였다. 10주령의 흰쥐를 (주)중앙실험동물을 통해 일본 SCL Inc.로부터 ICR 마우스를 공급받아 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 150~300 Lux의 조도로 12시간 간격(오전 8시~오후 8시)으로 조절되는 동물실험실에서 14일간 순화시킨 후, 10마리씩 구분하여 각각 실시예 5의 주정 추출물 및 이의 부탄올 분획물의 단회경구독성을 평가하였다. 먼저 각각의 시료를 미쇄하고 이를 올리브 오일에 녹인 후, 10마리에게 1,000mg/kg의 농도로 각각 경구투여 후, 일주일간 생존여부와 병적 이상증후를 관찰하였으며, 이후 부검하여 각종 장기의 출혈 및 혈청 생화학적 검사를 하였다. 대조구로는 올리브 오일만을 경구투여하였다. 그 결과 생존율은 100%였으며, 병적 이상 징후나 장기 출혈이 관찰되지 않았으며, GPT, GOT의 혈청 생화학적 검사 역시 대조구와 비교하여 유의점은 확인되지 않았다. 또한 부탄올 분획물의 10마리의 흰쥐에 10 mg/kg의 농도로 3주간 장기 투여한 경우에도 병적 이상 징후나 장기 출혈이 나타나지 않았다.

이러한 결과와 함께, 메밀은 수백년 전부터 주식 및 구황식물로 장기 식용해온 점을 고려할 때 메밀 추출물 및 분획물의 낮은 농도의 사용은 부가적인 문제점을 야기하지 않으리라 판단된다.

실시예 7: 실시예 5의 부탄올 분획물의 항혈전 동물 실험-폐색전 시험

실시예 6에서와 동일 조건에서 사육한 20주령의 흰쥐에 본 발명의 부탄올 분획물을 경구투여(150mg/kg 및 50mg/kg)한 후, 인위적으로 폐색전을 유발하였다. 혈전의 유도는 Kimura등의 방법(Kimura et al., *Arzneim Forsh. Drug Res.* 1985, 35, 144-1149; 이민섭 외, *생약학회지* 2000, 31; 373-382) 혈전 유발은 혈소판 응집시약(콜라겐 56.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 6.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 에피네프린을 녹인 헝스 발란스드 염 용액(Hanks' balanced salt solution, Sigma Co.USA)에 염화칼슘을 1mM 되도록 첨가하고 이를 하룻밤 절식시킨 흰쥐(45~50g)의 꼬리 정맥에 0.2mL 주사하여 유발하였다. 대조구로는 아스피린(150mg/kg)을 경구투여 하였으며, 시료 및 아스피린은 올리브 오일에 현탁하여 0.2mL 투여하였다. 용매 대조구로는 올리브 오일만을 경구투여한 흰쥐를 사용하였다. 경구투여 후 60분 후, 혈전유발 주사액을 주사 후, 경련지속 및 뒷다리 마비 시간을 측정한 결과는 표 8에 나타내었다. 각각의 실험구당 흰쥐는 12 마리를 사용하였다.

[표 8]

본 발명의 부탄올 분획물의 폐색전 활성 (단위: 분)

	용매 대조구	아스피린 투여구 (150 mg/kg)	메밀 분획물 투여구 (150 mg/kg)
경련지속시간	17.27 $\pm$ 7.55	15.37 $\pm$ 6.61	8.85 $\pm$ 5.84

실험 수 : 각각 12 마리

실시예 8: 실시예 5의 부탄올 분획물의 항혈전 동물 실험-전뇌 허혈성 모델에서의 혼수억제 시험

혈전생성에 따른 전뇌 허혈성 실험은 Schubert 등의 방법(Schubert et al., *J. Pharamcol. Exp. Ther.* 1968, 162, 352-359; 이민섭 외, *생약학회지* 2000, 31; 373-382)에 준해 수행하였다. 먼저 실시예 6에서와 동일 조건에서 사육한 20주령의 흰쥐에 본 발명의 부탄올 분획물을 경구투여(150mg/kg, 50mg/kg 및 25mg/kg)하고, 60분 후 비치사량인 1.87mg/kg 농도로 청산가리(KCN)를 꼬리정맥을 통해 주사하였다. 대조구로는 아스피린(150mg/kg)을 경구투여 하였으며, 시료 및 아스피린은 올리브 오일에 현탁하여 0.2mL 투여하였다. 용매 대조구로는 올리브 오일만을 경구투여한 흰쥐를 사용하였다. 전뇌 허혈모델계에서의 정향반사소실 후 회복까지의 시간을 측정한 결과는 표 9에 나타내었다.

[표 9]

본 발명의 부탄올 분획물의 전뇌 허혈성 혼수유발 억제 활성 (단위: 초)

	용매 대조구	아스피린 투여구 (150 mg/kg)	메밀 부탄올 분획물 투여구		
			25 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg
혼수 시간	514 ± 232	308 ± 119	279 ± 167	179 ± 127	227 ± 66

실험 수 : 각각 8 마리

표 9에 나타난 바와 같이, 메밀 부탄올 분획물 투여구에서는 혼수 상태가 짧게 나타나며, 그 회복 후 예후도 좋은 것으로 확인되었으며, 메밀 부탄올 분획물의 투여 농도는 50mg/kg 정도가 적당한 것으로 판단되었다.

실시예 9: 실시예 5의 부탄올 분획물의 항혈전 동물 실험-치사억제 시험

전뇌 허혈성 치사유발 실험은 Schubert 등의 방법(Schubert et al., *J. Pharamcol. Exp. Ther.* 1968, 162, 352-359; 이민섭 외, 생약학회지 2000, 31; 373-382)에 준해 수행하였다. 먼저 실시예 6에서와 동일 조건에서 사육한 20주령의 흰쥐에 본 발명의 부탄올 분획물을 경구투여(50mg/kg)하고, 60분 후 치사량인 2.5mg/kg 농도로 청산가리(KCN)를 꼬리정맥을 통해 주사하였다. 대조구로는 아스피린(150mg/kg)을 경구투여 하였으며, 시료 및 아스피린은 올리브 오일에 현탁하여 0.2 ml 투여하였다. 용매 대조구로는 올리브 오일만을 경구투여한 흰쥐를 사용하였다. 전뇌 허혈 모델계에서의 30분 후 치사율을 측정한 결과는 표 10에 나타내었다.

[표 10]

본 발명의 부탄올 분획물의 전뇌 허혈성 치사 억제 활성 (단위: %)

	용매 대조구	아스피린 투여구 (150 mg/kg)	메밀 분획물 투여구 (50 mg/kg)
치사 수/실험 수	24/29	12/30	9/30
치사율 (%)	82.7 %	40 %	30 %

상기의 표 8, 9 및 10에서 나타난 바와 같이 본 발명의 메밀 종자 추출물의 활성물질 분획물은 아스피린의 1/3의 양으로도 아스피린보다 우수한 혈전생성 억제, 혼수 억제, 치사 방지 효과를 나타내며, 아스피린이 가지는 위장 장애 등의 부작용을 가지지 않는 것으로 확인되었다.

발명의 효과

상기 실시예를 통해 살펴본 바와 같이, 본 발명은 메밀(*Fagopyrum esculentum* Moench) 종자 추출물을 함유하는 트롬빈 저해 혈전증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 메밀 종자 추출물 및 조정제물은 물, 주정, 메탄올, 부탄올 등의 다양한 용매로 추출하고, 그 추출물을 순차적 유기용매 분획을 통해 획득할 수 있으며, 추출물 및 조정제물은 우수한 트롬빈 저해활성을 나타내어, 혈전 생성을 효율적으로 억제할 수 있으며, 혈행개선을 통해 허혈성 뇌졸중 및 출혈성 뇌졸중과 같은 혈전증의 예방 및 치료용으로 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 메밀 종자 추출물 및 분획물은 급성경구독성 및 만성독성이 나타나지 않으며, 열 안정성이 우수하고, pH 2의 산성조건에서도 50% 이상의 트롬빈 저해 활성을 유지하여, 추출액, 분말, 환, 정 등의 다양한 형태로 가공되어 상시 복용 가능한 형태로 조제할 수 있다. 따라서, 본 발명은 제약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 다양한 용매를 이용한 메밀 종자 추출물의 항혈전 효과의 비교도이다.

도면

도면1

