(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0090412
(43) 공개일자 2015년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/212 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0011033
(22) 출원일자 2014년01월29일
심사청구일자 2014년01월29일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
조현정
대전광역시 중구 계룡로 922 남광하우스토리2차 202동 1203호
노주예
대전광역시 서구 관저북로 80 원앙마을2단지아파트 202동 1501호
류진협
대전광역시 중구 계룡로 922 남광하우스토리2차 202동 1203호
(74) 대리인
김대영

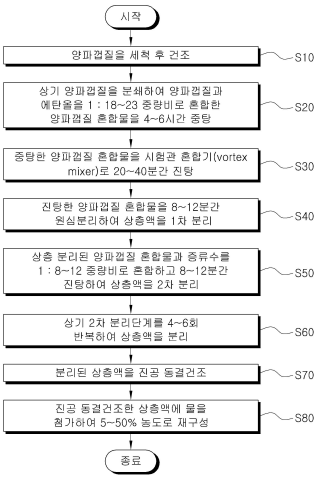
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **항혈전 효과를 갖는 양파껍질 추출물의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명에 따른 양파껍질 추출물의 제조방법은, 양파껍질을 세척 후 건조하는 단계; 상기 양파껍질을 분쇄하여 양파껍질과 에탄올을 1 : 18~23 중량비로 혼합한 양파껍질 혼합물을 4~6시간 중탕하는 단계; 중탕한 양파껍질 혼합물을 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20~40분간 진탕하는 단계; 진탕한 양파껍질 혼합물을 8~12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 단계; 상층 분리된 양파껍질 혼합물과 증류수를 1 : 8~12 중량비로 혼합하고 8~12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 단계; 및 1차 및 2차로 분리된 상층액을 진공 동결건조하는 단계;를 포함한다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0024028
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기본연구지원사업(유형II)
연구과제명 혈소판 신호전달체계 연구 및 항혈소판제 개발
기 여 율 1/1
주관기관 건양대학교산학협력단
연구기간 2010.09.01 ~ 2015.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

양파껍질을 세척 후 건조하는 단계;

상기 양파껍질을 분쇄하여 양파껍질과 에탄올을 1 : 18~23 중량비로 혼합한 양파껍질 혼합물을 4~6시간 중탕하는 단계;

중탕한 양파껍질 혼합물을 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20~40분간 진탕하는 단계;

진탕한 양파껍질 혼합물을 8~12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 단계;

상층 분리된 양파껍질 혼합물과 증류수를 1 : 8~12 중량비로 혼합하고 8~12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 단계; 및

1차 및 2차로 분리된 상층액을 진공 동결건조하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 양파껍질 추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 2차 분리단계를 4~6회 반복하여 상층액을 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 양파껍질 추출물의 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

진공 동결건조한 상층액에 물을 첨가하여 5~50% 농도로 재구성하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 양파껍질 추출물의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 1차 분리단계에서 1800×g로 원심분리하는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 양파껍질 추출물의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 진공 동결건조는 -75 ~ -65℃에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 항혈전 효과를 갖는 양파껍질 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항혈전 효과를 갖는 양파껍질 추출물의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 양파껍질로부터 세포독성 없으면서 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 생성할 수 있는 항혈전 효과를 갖는 양파껍질 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근에 식생활이 서구화됨에 따라 고혈압, 동맥경화, 심혈관 질환들의 순환기계 질병이 증가되고 있다. 최근 선

진국의 조사에 의하면 혈관 순환기계 질환이 현대인의 사망 원인의 1위를 차지하고 있으며, 우리 나라의 경우에도 통계청의 보고에 의하면 2000년 기준으로 암(21.4%), 뇌혈관 질환(16%), 심장병(8.3%)의 순위로 나타나 있어 심혈관계 질환으로 인한 사망률의 합계가 암에 의한 사망률을 상회하고 있는 실정이다.

[0003] 이러한 순환기계 질병의 원인은 혈관 손상 부위에서의 혈전의 형성인데, 이러한 현상은 ① 혈관 (vascular compartments) 손상, ② 혈소판 응집(platelet aggregation), ③ 혈장 응고 인자 (plasma coagulation factor)에 의한 혈액 응고가 동일한 영역에서 일어나는 병리 현상이다.

[0004] 이와 같은 혈전을 예방하고 치료하기 위하여 현재 많은 약물들이 개발되었으나 혈관 손상 부위에서의 출혈 시간의 연장과 위장 점막에서의 내출혈 또는 전신성 출혈 등의 부작용으로 인하여 장기 치료의 목적에는 적합하지 못하다. 그러므로 좀 더 안전하고 효과적인 항혈소판제의 개발을 위해 많은 연구가 집중되고 있으며, 여러 가지 부작용을 일으키는 의약품과는 달리 반복해서 장기간 섭취하기 때문에 유효 성분이 미량이거나 그 활성이 매우 적은 경우라 하더라도 항상 공급됨으로서 중요한 영향을 줄 수 있는 식품으로부터 그 성분을 찾는 것이 필요하며, 그 중에서 peptide는 구조 및 활성이 다양하고, protease류에 의해 분리되며 유전 공학 기술에 의한 생산 및 개조가 가능하고 높은 안전성을 기대할 수 있다는 장점이 있어 이에 대한 연구가 진행되고 있다

[0005] 한편, 양파가 몸에 좋다는 것은 누구나 알고 있다. 따라서 양파는 거의 매일 식단에 오르다시피하는 단골 식품일 뿐만 아니라, 최근에는 양파를 즙으로 만들어 건강식품으로 활용하고 있다. 또한 양파에서 양파속보다 양파껍질이 더 좋다고 알려져 있다. 그래서 사람들은 양파껍질을 세척하고 말려서 차처럼 달여 마시기도 한다. 건강식으로 혹은 다이어트 용으로 달여 마시는데, 이는 양파껍질에서 추출되는 퀘라스틴 성분이 콜레스테롤 수치를 낮추거나 고혈압 혹은 당뇨환자들에게 도움을 준다고 보고되고 있기 때문이다.

[0006] 이와 같이 양파껍질의 유효성분을 활용하기 위한 특허로는, 한국공개특허 제10-2012-0025351호(양파껍질 추출물을 함유하는 혈당강하제 조성물 및 양파껍질 추출물의 제조방법), 한국등록특허 제10-1317945호(양파껍질의 아임계 수추출물의 항산화제 용도), 한국등록특허 제10-1258632호(양파껍질의 아임계 수추출물의 항균제 용도), 한국공개특허 제10-2010-0040740호(양파껍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 지질대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물), 한국공개특허 제10-2010-00040739호(양파껍질 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방간 질환의 예방 또는 치료용 조성물), 한국공개특허 제10-2006-0028689호(양파껍질 추출물을 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물), 한국공개특허 제10-2007-0108336호(양파껍질 추출물을 포함하는 지방축적억제 또는 비만 예방 및 치료용 조성물과 이를 포함하는 약학적 제제 및 식품) 등이 있다.

[0007] 그러나 아직까지 양파껍질을 이용하여 항혈전에 효능을 나타내는 조성물은 개발되지 않고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 창출된 것으로, 본 발명의 목적은, 양파껍질로부터 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 생성하기 위한 양파껍질 추출물의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 목적을 위해 본 발명에 따른 양파껍질 추출물의 제조방법은, 양파껍질을 세척 후 건조하는 단계; 상기 양파껍질을 분쇄하여 양파껍질과 에탄올을 1 : 18~23 중량비로 혼합한 양파껍질 혼합물을 4~6시간 중탕하는 단계; 중탕한 양파껍질 혼합물을 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20~40분간 진탕하는 단계; 진탕한 양파껍질 혼합물을 8~12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리하는 단계; 상층 분리된 양파껍질 혼합물과 증류수를 1 : 8~12 중량비로 혼합하고 8~12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리하는 단계; 및 1차 및 2차로 분리된 상층액을 진공 동결건조하는 단계;를 포함한다.

[0010] 그리고, 상기 2차 분리단계를 4~6회 반복하여 상층액을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있고, 이에 추가하여 진공 동결건조한 상층액에 물을 첨가하여 5~50% 농도로 재구성하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0011] 또한 상기 1차 분리단계에서 1800×g로 원심분리하고, 상기 진공 동결건조는 -75 ~ -65℃에서 이루어지는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 양파껍질 추출물의 제조방법에 의하면, 양파껍질로부터 세포독성 없으면서 항혈전 효능을 나타내는 추출물을 생성할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명에 따른 양파껍질 추출물의 제조방법을 도시한 순서도,

도 2는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 양파껍질 추출물의 효과를 나타낸 그래프,

도 3은 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 양파껍질 추출물의 TXA_2 생성 억제 효과를 나타낸 그래프,

도 4는 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 양파껍질 추출물의 $[Ca^{2+}]_i$ 억제 효과를 나타낸 그래프,

도 5는 혈소판에서 양파껍질 추출물의 Thromboxane A_2 synthase(TXAS) activity 억제 효과를 나타낸 그래프,

도 6은 혈소판에서 양파껍질 추출물의 Cyclooxygenase (COX)-1 activity 억제 효과를 나타낸 그래프,

도 7은 Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 양파껍질 추출물의 cAMP 상승 효과를 나타낸 그래프,

도 8은 혈소판에서 양파껍질 추출물의 세포 독성을 나타낸 그래프,

도 9는 양파껍질 추출물을 경구 투여한 비만 유도 흰쥐에서 항혈소판 효과를 나타낸 그래프,

도 10은 양파껍질 추출물을 경구 투여한 비만 유도 흰쥐에서 항혈액응고 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 양파껍질 추출물의 제조방법의 구성을 자세히 설명한다.

[0015] 도 1은 본 발명에 따른 양파껍질 추출물의 제조방법을 도시한 순서도이다.

[0016] 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 양파껍질 추출물의 제조방법은 양파껍질을 세척 후 건조하는 단계로부터 개시된다(단계 S10). 건조된 양파껍질은 분쇄하여 양파껍질과 에탄올(ethanol)을 1 : 18~23 중량비로 혼합하고, 이렇게 혼합된 양파껍질 혼합물을 4~6시간 중탕한다. 이때 사용되는 에탄올은 70% 수용액인 것을 사용한다(단계 S20).

[0017] 그 후 중탕한 양파껍질 혼합물을 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20~40분간 진탕하고(단계 S30), 이를 1800×g에서 8~12분간 원심분리하여 상층액을 1차로 분리해 낸다(단계 S40).

[0018] 그리고 상층 분리된 양파껍질 혼합물에 증류수를 혼합한다. 이때 양파껍질 혼합물과 증류수의 중량비는 1 : 8~12인 것이 바람직하고, 이를 8~12분간 진탕하여 상층액을 2차로 분리한다. 여기서 진탕(shaking)이란 시료로부터 분석성분을 추출하기 위하여 일정한 속도로 흔들리게 하는 것을 의미한다.

[0019] 또한 상층액 분리를 위하여 상기 2차 분리단계를 다수회 반복한다. 이러한 과정은 대략 4~6회 정도 수행하고, 6회를 초과하면 희석이 과도하게 되어 효과를 발휘하기 어렵고 오히려 이전에 분리된 상층액을 희석시키기 때문에 바람직하지 않다(단계 S50 및 S60).

[0020] 이렇게 분리된 상층액은 Freeze Dryer(Ilshin Biobase)를 이용하여 -75 ~ -65℃ 범위로 진공 동결건조한다(단계 S70). 진공 동결건조된 상층액에는 물을 첨가하여 원하는 농도로 재구성한다. 적정 농도는, 이하의 실험예에서 알 수 있듯이 대략 5~50% 범위인 것이 바람직하다(단계 S80).

[0021] 이와 같은 과정을 통해 생성되는 양파껍질 추출물(Onion Peel Extract, 이하 "OPE"라 함)의 수득률은 14.8±1.7 정도이다.

[0022] 다음으로 본 발명에 따른 OPE에 대한 효과를 검증하기 위한 실험방법과 결과를 설명한다.

[0023] **A. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 OPE의 효과**

[0024] (1) 실험방법

[0025] 1) Washed rat platelet 제조

[0026] 대한바이오링크(대한민국 충북)에서 구입한 SD Rat(8 week-old, male)의 전혈을 분리하여 180×g, 25℃에서 10분 동안 원심분리하고 적혈구를 침전시켜 순수한 PRP(Platelet-Rich Plasma)를 얻었다. 이것을 다시 1800×g, 25℃에서 10분 동안 원심분리하여 PPP(Platelet-Poor Plasma)와 혈소판(PLTs)으로 분리하였다.

[0027] 분리된 혈소판은 Washing buffer(128 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.36 mM NaH_2PO_4, 12 mM $NaHCO_3$, 5.5 mM Glucose, 1 mM EDTA, pH 6.9)를 이용하여 washing하고 1800×g, 25℃에서 10분 동안 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. Washing buffer에서 분리된 혈소판을 suspending buffer(128 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.36 mM NaH_2PO_4, 12 mM $NaHCO_3$, 5.5 mM Glucose, 0.49 mM $MgCl_2$, pH 7.4) 적당량을 PLTs에 조심스럽게 첨가하여 pipette으로 cell suspension을 실시하였다. Cell counting을 하기 위해서 이 중 일부를 취하여 여분의 suspending buffer로 20배 희석한 후, UV/visible spectrophotometer를 이용하여 660㎚에서 흡광도를 측정하였다. 660㎚에서 흡광도 값이 1.1일 때 1×10^8개의 PLTs를 의미하므로, 원하는 cell 수, 5×10^8 platelets/㎖가 되도록 suspending buffer를 첨가하여 조정하였다.

[0028] 2) 혈소판 응집반응 관찰

[0029] 모든 platelets aggregation은 AGGREGOMETER(Chrono-Log Co.)를 이용하여 37℃에서 light transmission의 변화를 측정하였다. In vitro에서 반응계를 250㎕로 하여 washed PLTs에 $CaCl_2$ 2mM를 첨가하여 3분간 preincubation하고, collagen(5㎍/㎖)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 측정한 것을 controls로 하였다. 그리고 같은 조건에, 검토하고자 하는 시료(OPE)를 함께 첨가한 후 collagen(5㎍/㎖)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 측정하여 시료의 영향을 알아보았다.

[0030] (2) 실험결과

[0031] OPE에 의한 혈소판 응집 억제효과를 측정하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, Collagen(5㎍/㎖)으로 응집을 유도하였을 때, 응집률은 74.9 ± 2.7 %로 증가하였으나 OPE를 다양한 농도로 처리하였을 때(50, 100, 500㎍/㎖), 유의성을 가지고 농도 의존적으로 혈소판 응집이 감소되었으며 억제율이 농도 의존적으로 증가하였다(각각 56.4 ± 6.7, 25.3 ± 7.3, 2.0 ± 1.2 %). 따라서 OPE가 혈소판 응집 억제 효과를 가짐을 알 수 있다. (IC_{50} = 80㎍/㎖)

[0032] **C. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 OPE의 TXA_2 생성 억제 효과**

[0033] (1) 실험방법

[0034] OPE의 TXB_2 생성 억제능을 측정하기 위하여 "A"에서 기술한 방식으로 8분간 혈소판 응집반응을 시행한 후, ice-cold EDTA(5mM) and indomethacin (0.2mM)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. TXA_2의 안정한 상태인 TXB_2의 양을 TXB_2 EIA kit(Cayman Chemical)를 이용하여 측정하였으며 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참조하였다.

[0035] (2) 실험결과

[0036] TXA_2는 혈소판에서 강력한 혈소판 응집 요소로 작용한다. OPE가 TXB_2(안정한 형태의 TXA_2)의 생성에 관여하는지 알아보고자 TXB_2 생성을 측정하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, Collagen으로 응집을 유도하였을 때, TXB_2의 양이 46.4 ± 7.8 ng/10^8 platelets로 증가하였으나 OPE를 농도별로 처리하였을 때(50, 100, 500㎍/㎖), 유의성을 가지고 농도 의존적으로 TXB_2 생성이 억제되었다(20.4 ± 7.8, 17.3 ± 1.8, 15.8 ± 5.5 ng/10^8 platelets). 따라서 OPE는 TXA_2를 억제하여 항혈소판 효과를 갖는다.

[0037] **C. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 OPE의 $[Ca^{2+}]_i$ 억제 효과**

[0038] (1) 실험방법

[0039] Concentrated PRP를 만드는 과정 가운데 washing buffer와 혈소판(PLTs)으로 분리되면 상층의 washing buffer를 조심스럽게 덜어낸 후 PLTs에 다시 suspending buffer 10㎖를 첨가했다. 여기에 1mM의 Fura 2/AM을 50㎕를 넣어서 final 농도가 5μM이 되도록 첨가했다. 이것을 부드럽게 inversion한 후 37℃에서 60분간 incubation하고, incubation이 끝나면 1800×g, 25℃에서 10분 동안 원심시켜 상층의 suspending buffer 층과 Fura 2/AM이 loading된 PLTs층으로 분리했다. 하층의 PLTs suspending buffer를 첨가하여 2회 세척 후, suspending buffer를 첨가하여 cell suspension하였고 cell counting하여 5×10^8 Fura 2/AM loaded platelets/㎖로 조정하였다. 빛을 차단하기 위해 aluminum foil로 wrapping하여 위의 과정을 수행하였다. Fura 2/AM이 loading된 혈소판을 이용하여 fluorescence의 변화를 SPF 25 fluorimeter(Kontron)를 이용하여 측정하였다. Excitation 340nm, emission 510nm로 setting하여 37℃에서 8분간 time drive를 시행하였는데 3분되는 지점에 collagen(10㎍/㎖)을 첨가하여 세포질 내 Ca^{2+}의 양을 측정하였다. 실제 $[Ca^{2+}]_c$은 relative fluorescence(rf)로 나타나기 때문에 F_{max}와 F_{min}을 각각 측정한 후 이들 값과 Fura 2/AM의 분해정수(K_d=224nM)를 아래의 [수학식 1]에 대입하여 혈소판 내부의 $[Ca^{2+}]_c$ 계산하였다.

수학식 1

[0040] $$[Ca^{2+}]_c = K_d \times (F_0 - F_{min})/(F_{max} - F_0)$$

[0041] F_o는 자극 전의 fluorescence이다. 또 F_{min}는 최소 fluorescence로서, $CaCl_2$를 첨가하지 않은 상태에서 10% triton X-100과 2M tris-300mM EGTA를 첨가하여 측정하였고, F_{max}는 최대 fluorescence로서, 충분한 $CaCl_2$가 존재하는 상태에서 10% triton X-100을 첨가하여 측정하였다.

[0042] (2) 실험결과

[0043] 칼슘은 강력한 혈소판 응집 촉진 물질로 작용한다. 따라서 OPE가 세포질내 칼슘동원($[Ca^{2+}]_i$)에 미치는 영향을 측정하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 안정한 상태의 혈소판에서 Collagen으로 응집을 유도하였을 때 $[Ca^{2+}]_i$이 98.2 ± 10.3에서 704.3 ± 76.7nM로 증가하였으며, OPE를 농도별로 처리하였을 때(50, 100, 500㎍/㎖), 유의

성을 가지고 농도 의존적으로 $[Ca^{2+}]_i$ 이 억제되었다(각각 450.1 ± 85.4, 143.1 ± 7.0, 103.6 ± 2.9nM). 따라서 OPE는 $[Ca^{2+}]_i$을 억제하여 항혈소판 효과를 나타낸다.

[0044] **D. 혈소판에서 OPE의 Thromboxane A_2 synthase (TXAS) activity 억제 효과**

[0045] (1) 실험방법

[0046] 혈소판에서 TXAS activity를 측정하고자 혈소판을 sonicator를 이용하여 platelet lysates를 제조하였다. Platelet lysates(10㎍-protein)은 OPE(50, 100 ㎍/㎖) 및 TXAS activity를 선택적으로 억제한다고 알려진 ozagrel(11nM)를 처리하여 37℃에서 5분간 preincubation 하였다. 반응은 PGH_2를 기질로 첨가하여 37℃에서 1분간 유도하였으며, 1M citric acid를 이용하여 반응을 정지시키고 1N NaOH를 첨가하여 중화하였다. 생성된 TXB_2의 양을 TXB_2 EIA kit(Cayman Chemical)를 이용하여 측정하였으며 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참조하였다.

[0047] (2) 실험결과

[0048] TXA_2 생성이 억제됨에 따라, Prostaglandin이 TXA_2로 합성되는 과정에서 thromboxane synthase(TXAS) activity를 필요로 하기 때문에 OPE의 TXAS activity의 억제 효과를 측정하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, OPE를 농도별로 처리하였을 때(50, 100㎍/㎖), Control(122.3 ± 1.5ng/min/mg-protein)과 비교하여 농도 의존적으로 TXAS activity를 감소시켰다(각각 87.1 ± 7.2, 76.1 ± 12.6 ng/min/mg-protein). Positive control로는 TXAS activity를 선택적으로 억제하는 Ozagrel (IC_{50} = 11nM)을 사용하였으며 OPE의 IC_{50}값의 근사치인 100㎍/㎖과 비교하였을 때 2배 더 강한 억제 효과를 보였다. 따라서 OPE는 TXAS activity를 억제하여 TXA_2 생성을 방해한다.

[0049] **E. 혈소판에서 OPE의 Cyclooxygenase(COX)-1 activity 억제 효과**

[0050] (1) 실험방법

[0051] 1%의 protease inhibitor가 함유된 혈소판 부유액을 Sonicator를 이용하여 Platelets lysate를 제조하였다. Platelet lysates(10㎍-protein)은 OPE(50, 100 ㎍/㎖) 및 COX-1 activity를 선택적으로 억제한다고 알려진 SC-560(330nM)과 aspirin(500μM)를 처리하여 37℃에서 30분간 preincubation하였다. 반응은 arachidonic acid를 기질로 첨가하여 37℃에서 1분간 유도하였으며, COX-1 activity fluorescent assay(Cayman Chemical)를 이용하여 synergy HT multi-model micro plate reader(BioTek Instruments, Winooski, VT., USA) 로 측정하였다. 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참조하였다.

[0052] (2) 실험결과

[0053] TXAS activity가 감소됨에 따라, Arachidonic acid(20:4)가 prostaglandin으로 합성되는 과정에서 COX-1 activity을 필요로 하기 때문에 OPE가 COX-1 activity에 미치는 영향을 측정하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, OPE를 농도별로 처리하였을 때(50, 100㎍/㎖), Control(2.6 ± 0.1nM/min/mg-protein)과 비교하여 농도 의존적

으로 TXAS activity를 감소시켰다(각각 1.3 ± 0.2, 0.8 ± 0.1 nmol/min/mg-protein). Positive control로는 COX-1 activity를 선택적으로 억제하는 Aspirin(500μM)과 SC-560(330nM)을 사용하였다. OPE는 COX-1 activity를 억제하여 TXA_2 생성을 방해하며 특히, OPE의 IC_{50}값의 근사치인 100㎍/㎖과 Aspirin (IC_{50} = 500μM)을 비교하였을 때, OPE가 약 3.5배 더 강한 억제효과를 나타냈다. 이는 OPE가 천연물질로서 Aspirin에 비해 강력한 항혈소판 효과를 나타내므로 Aspirin과 같은 기존약물을 대체할 수 있는 가능성이 높음을 시사한다.

[0054] **F. Collagen으로 응집을 유도한 혈소판에서 OPE의 cAMP 상승 효과**

[0055] (1) 실험방법

[0056] cAMP와 cGMP를 측정하기 위하여 "A"에서 기술한 방식으로 혈소판 응집반응을 유도한 뒤, 8분이 되는 시점에서 80% ice-cold ethanol을 첨가하여 반응을 정지시켰으며, cAMP와 cGMP값은 각각 cAMP와 cGMP EIA kits(BioVision)을 이용하여 측정하였으며 세부적인 방법은 제조사의 설명서를 참고하였다.

[0057] (2) 실험결과

[0058] Cyclic adenosine monophosphate(cAMP)와 Cyclic guanosine monophosphate(cGMP)는 혈소판 응집 억제하는 second messenger로 작용한다. ATP와 GTP가 각각 cAMP와 cGMP로 전환되어, 각각에 의존적인 Kinase activity가 상승되어 특정 단백질이 phosphorylastion되면서 항혈소판 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서 cAMP 또는 cGMP에 있어서 OPE의 효과를 측정하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, Collagen으로 유도된 혈소판에서 안정된 상태의 cAMP(36 ± 5.1 pmol/10^8 platelets)와 비교하여 감소하였다가 (28.3 ± 6.0 pmol/10^8 platelets), OPE를 농도별로 처리하였을 때(50, 100, 500㎍/㎖), cAMP가 유의성을 가지고 농도 의존적으로 상승되었다(각각 51.8 ± 4.8, 54.7 ± 4.8, 71.1 ± 4.1 pmol/10^8 platelets, 도 7A 참조). 그러나, OPE는 cGMP를 상승시키지 않았다(도 7B 참조). 이러한 결과는 OPE가 cGMP가 아닌 cAMP를 상승시켜 항혈소판 효과를 나타냄을 의미한다.

[0059] **G. 혈소판에서 OPE의 세포 독성**

[0060] (1) 실험방법

[0061] 혈소판에서 OPE의 세포독성을 알아보기 위하여 LDH 방출을 측정하였다. Washed platelets (10^8 platelets/ml)은 혈소판 응집반응과 같은 방법으로 preincubation한 뒤, 상층액을 LDH assay kit (Cayman Chemical)를 이용하여 측정하였다. 세부적인 실험 방법은 제조사의 설명서를 참고하였다.

[0062] (2) 실험결과

[0063] LDH는 세포 손상에 의한 독성여부를 측정하는 지표로 사용된다. OPE의 혈소판 세포독성 여부를 측정하기 위하여 LDH release를 확인하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, OPE를 농도별로 처리하였을 때(50, 100, 500㎍/㎖) Control과 비교하여 LDH release에 영향을 미치지 않았다. 이는 OPE의 뛰어난 항혈소판 효과가 본 실험에서 사용된 농도 범위 안에서 세포 독성 없이 이루어졌음을 의미하며, 약물 개발에 있어서 가장 중요한 독성 문제를 해결하여 향후 OPE의 항혈소판 제제로의 개발 가능성을 제시한다.

[0064] **H. OPE의 high fat diet(HFD, 고지방식이)로 비만을 유도한 흰쥐에서 항혈소판 효과**

[0065] (1) 실험방법

[0066] 동물(SD rat, 6 week-old, Male)은 7일간 일반 식이 (Normal diet, ND)로 적응기간을 거친 후, HFD control group과 두 OPE group은 다시 7일간 HFD로 비만을 유도하였다. ND-control group은 일반 표준 사료를 이용하여 사육하였다. 각 실험군(n = 3)은 두 개의 control group(ND, HFD)과 두 개의 OPE group(25, 50㎎/㎏)으로 구성되었으며 OPE group은 HFD를 투여하면서 15일간 약물을 투여하였다. 식이 및 식수는 자유롭게 허용하되 양은 매일 기록하였으며 몸무게는 이틀에 한번씩 측정하였다. 모든 동물 실험은 건양대학교 실험동물 윤리 위원회의 지침에 따라 진행되었다.

[0067] In vitro에서 OPE의 항혈소판 효과를 바탕으로, 체내에서 OPE의 항 혈소판 효과를 측정하고자 하였다. 흰쥐(Sprague-Dawley rat, male, 7 weeks)를 이용하여 7일간 일반식이로 적응기간을 거친 후, 7일간 HFD로 비만을 유도한 뒤, 15일간 OPE를 ㎏당 25㎎, 50㎎을 각각 HFD와 함께 경구 투여하였다. HFD는 일반 식이와 비교해 Lard가 21% 함유되어 있어 쉽게 비만이 유도되며, 비만 유도 흰쥐 모델은 고지혈증과 과도한 혈소판 활성화를 동반하여 심혈관계 질환 연구에 대표적으로 사용된다. 동물의 체중은 이틀에 한 번씩 측정하였으며 식이 및 식수량은 매일 측정하였다. Group Ⅰ은 일반식이(ND) control, Group Ⅱ는 고지방 식이(HFD)-conrtol, Group Ⅲ은 HFD와 함께 OPE 25㎎/㎏을, Group Ⅳ는 HFD와 함께 OPE를 50㎎/㎏을 15일간 투여하였다. 이와 같은 방법에 의한 HFD로 비만을 유도한 흰쥐의 체중변화 및 식이량은 [표 1]과 같다.

표 1

Groups	Body weight (g)		Body weight gain (g/day)	Food intake (g/rat/day)
	Initial	Final		
Ⅰ	187.5 ± 3.5	293.3 ± 11.5	4.8 ± 0.6	20.8 ± 3.3
Ⅱ	216.7 ± 5.8*	331.7 ± 16.1	5.5 ± 0.6	21.1 ± 2.8
Ⅲ	221.7 ± 2.9	323.3 ± 32.1	4.8 ± 1.6	20.2 ± 2.4
Ⅳ	226.7 ± 11.5	333.3 ± 23.1	5.1 ± 0.5	19.4 ± 2.7

[0068]

[0069] 마지막 OPE 투여를 마치고 12시간 절수 및 절식에 들어간 실험 동물을 이용하여 "A"에서 기술한 방식으로 washed platelet(10^8/㎖)을 제조하였다. 이는 AGGREGOMETER (Chrono-Log Co.)를 이용하여 37℃에서 light transmission의 변화를 측정하였다. In vitro에서 반응계를 250㎕로 하여 washed PLTs에 $CaCl_2$ 2mM를 첨가하여 3분간 preincubation하고, collagen(5㎍/㎖)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 측정한 것을 control로 하였다.

[0070] (2) 실험결과

[0071] OPE를 경구 투여한 비만 유도 흰쥐의 혈소판을 분리하여 OPE의 효과를 측정하였다. 도 9에 도시된 바와 같이, HFD-Control의 혈소판 응집률이 일반 식이 Control과 비교하여 유의적으로 증가하였다. 그러나 OPE를 50㎎/㎏ 투여한 Group Ⅳ에서 HFD Control과 비교하여 응집률이 18.8% 억제되었다. 이는 OPE의 항혈소판 효과가 in vitro 뿐만 아니라 in vivo에도 유효한 효과를 가짐을 의미한다.

[0072] **I. HFD로 비만을 유도한 흰쥐의 혈청에서 OPE의 Triglyceride(TG) 감소 효과**

[0073] (1) 실험방법

[0074] OPE에 의한 지질 대사 조절 여부를 측정하기 위해 TG assay를 시행하였다. 실험 동물의 전혈을 이용하여 1800× g 에 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이를 아산제약 TG assay kit을 이용하여 측정하였으며, TG의 양은 spectrophotometer를 이용하여 550㎚에서 정량하였다.

[0075] (2) 실험결과

[0076] 부가적으로 OPE가 HFD로 비만을 유도한 흰쥐의 혈소판 응집을 억제시킴에 따라, OPE의 지질 대사 조절 여부를 측정하고자 TG level을 확인하였고, 그 결과는 다음의 [표 2]와 같다.

표 2

[0077]

Groups	Triglyceride (mg/dL)
I	53.3 ±8.8
II	72.81±2.6*
III	71.52±2.5
IV	57.44±1.1**

[0078] 일반 식이 Control Group Ⅰ과 비교하여 HFD를 투여한 Group Ⅱ에서 TG level이 유의적으로 증가하였으나, OPE 50㎎/㎏을 투여한 그룹(Group Ⅳ)에서 TG level이 감소하였다. 특히 TG level이 일반 식이 Control Group Ⅰ 정도로 회복된 결과에 따라, OPE의 효과를 지질대사 조절로 확장할 수 있으며, 향후 혈관질환과 더불어 나타나는 고지혈증을 예방 또는 치료하는 새로운 약물로써 개발 가능성을 제시한다.

[0079] **J. HFD로 비만을 유도한 흰쥐에서 OPE의 간 독성**

[0080] (1) 실험방법

[0081] OPE에 의한 간독성 여부를 측정하기 위해 AST 및 ALT assay를 시행하였다. 실험 동물의 전혈을 이용하여 1800× g 에 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이를 아산제약 AST, ALT assay kit을 이용하여 측정하였으며, AST, ALT의 양은 spectrophotometer를 이용하여 505㎚에서 정량하였다.

[0082] (2) 실험결과

[0083] HFD로 비만을 유도한 흰쥐에서 OPE의 간독성 여부를 확인하기 위하여 AST 및 ALT를 측정하였고, 그 결과는 다음의 [표 3]과 같다.

표 3

[0084]

Groups	Liver weight (g)	Karmen/ml	
		AST	ALT
I	10.1 ± 1.5	9.7 ± 0.6	5.6 ± 0.1
II	11.3 ± 0.9	9.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1
III	11.1 ± 0.9	9.5 ± 0.8	4.8 ± 0.3
IV	12.4 ± 0.7	10.4 ± 0.5	5.0 ± 0.3

[0085] OPE는 AST 및 ALT level을 증가에 영향을 미치지 않았다. 이는 OPE가 간 독성 없이 항 혈소판 및 지질대사 조절 효과를 가짐을 의미한다. OPE는 실효성에 있어 in vitro에 국한되어지지 않고 체내에서도 유효한 효과를 갖기 때문에 그 의의가 크다고 할 수 있으며, 실험 쥐의 간 무게 및 독성의 유의적 변화없이 항 혈소판 효과를 가짐에 따라, OPE를 향후 심혈관계 질환의 치료 및 예방에 있어서 새로운 전략으로 제시하고자 한다.

[0086] **K. OPE를 경구 투여한 비만 유도 흰쥐에서 항혈액응고 효과**

[0087] (1) 실험방법

[0088] OPE의 동물실험에서 coagulation에 미치는 영향을 측정하고자 prothrombin time(PT)과 activated partial thromboplastin time(aPTT)을 측정하였다. Sod. Citrate가 처리된 실험 동물의 전혈을 이용하여 1800×g에 10분간 원심분리한 plasma를 이용하여 PT와 aPTT를 coagulation analyzer(TS 4000, MD pacific)로 측정하였다. PT 시험을 위해 plasma를 2분간 37℃에서 배양한 후, PT reagent (Thermo Scientific Co.)를 첨가하여 clot이 형성되는 시간을 측정하였으며, aPTT 시험을 위해 plasma를 aPTT reagent (Thermo Scientific Co.)을 처리하여 3분간 37℃에서 배양하고 0.02M $CaCl_2$ (Thermo Scientific Co.)를 첨가하여 clot이 형성되는 시간을 측정하였다.

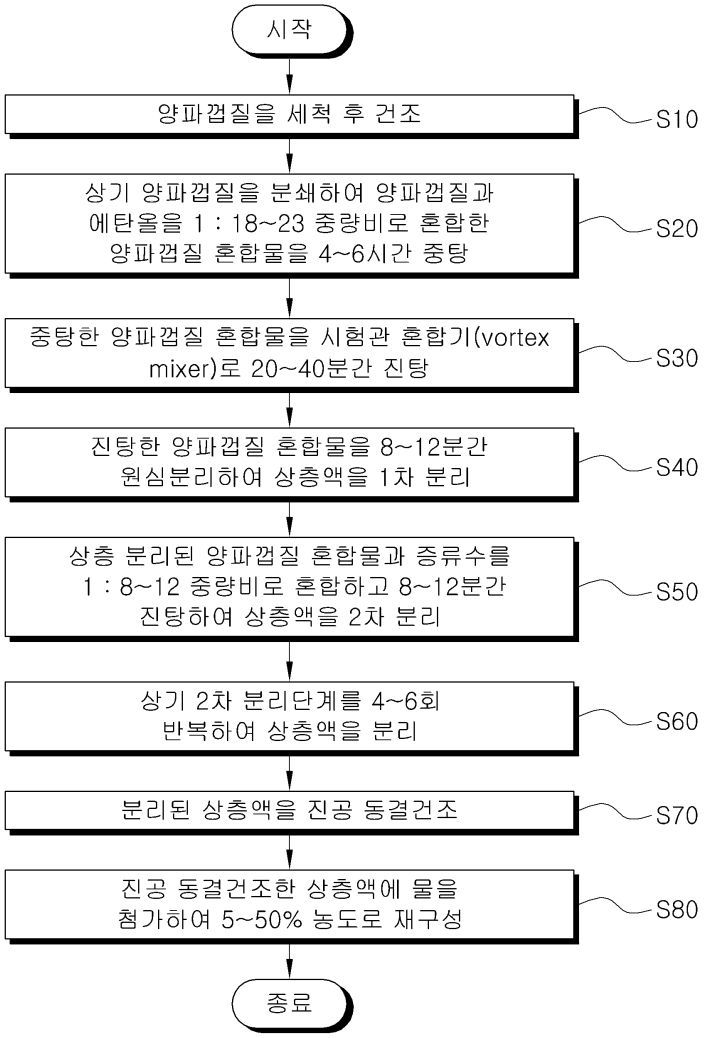
[0089] (2) 실험결과

[0090] HFD로 비만을 유도한 흰쥐에서 OPE의 출혈 부작용을 확인하기 위해 외인계 응고기전인 PT와 내인계 응고기전인 APTT를 측정하였다. 그 결과, 도 10에 도시된 바와 같이, PT와 APTT 둘다 영향력이 없기 때문에 출혈 부작용이 없음을 제시하는 바이다. 이로써 Aspirin 등의 항혈소판제가 갖는 출혈 부작용을 해결하는 안전한 천연물 신약으로서의 의미를 가짐을 확인할 수 있다.

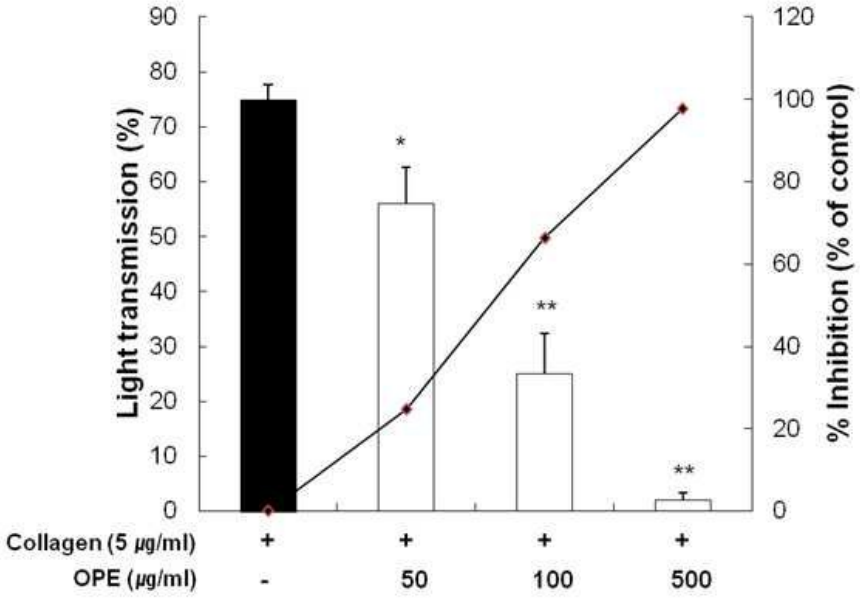
[0091] 본 발명의 권리는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

도면

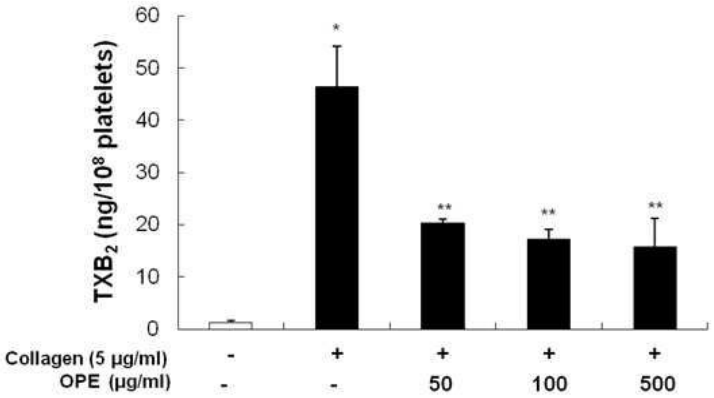
도면1


시작
양파껍질을 세척 후 건조
S10
상기 양파껍질을 분쇄하여 양파껍질과 에탄올을 1 : 18~23 중량비로 혼합한 양파껍질 혼합물을 4~6시간 중탕
S20
중탕한 양파껍질 혼합물을 시험관 혼합기(vortex mixer)로 20~40분간 진탕
S30
진탕한 양파껍질 혼합물을 8~12분간 원심분리하여 상층액을 1차 분리
S40
상층 분리된 양파껍질 혼합물과 증류수를 1 : 8~12 중량비로 혼합하고 8~12분간 진탕하여 상층액을 2차 분리
S50
상기 2차 분리단계를 4~6회 반복하여 상층액을 분리
S60
분리된 상층액을 진공 동결건조
S70
진공 동결건조한 상층액에 물을 첨가하여 5~50% 농도로 재구성
S80
종료

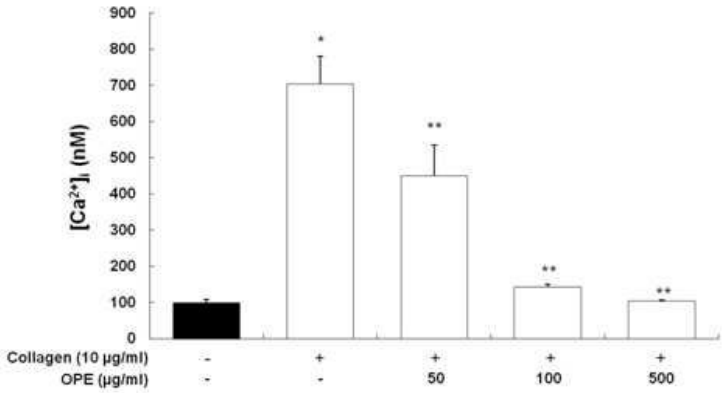
도면2


Light transmission (%)
% Inhibition (% of control)
Collagen (5 μg/ml)
OPE (μg/ml)
-
50
100
500

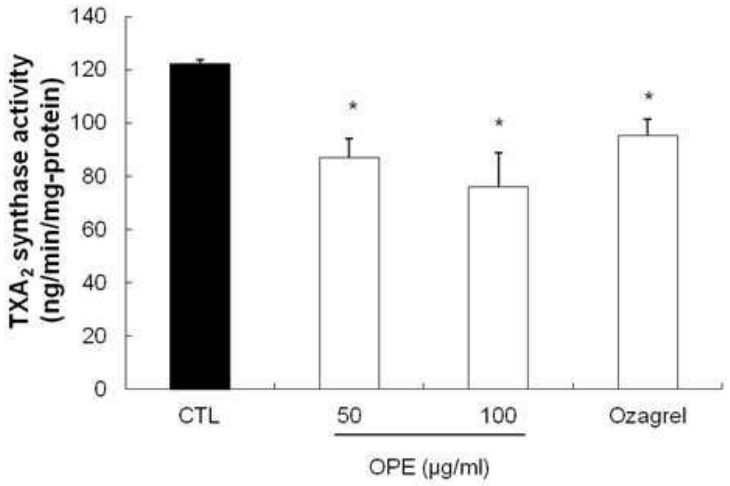
도면3


TXB2 (ng/10^8 platelets)
Collagen (5 μg/ml)
OPE (μg/ml)
-
50
100
500

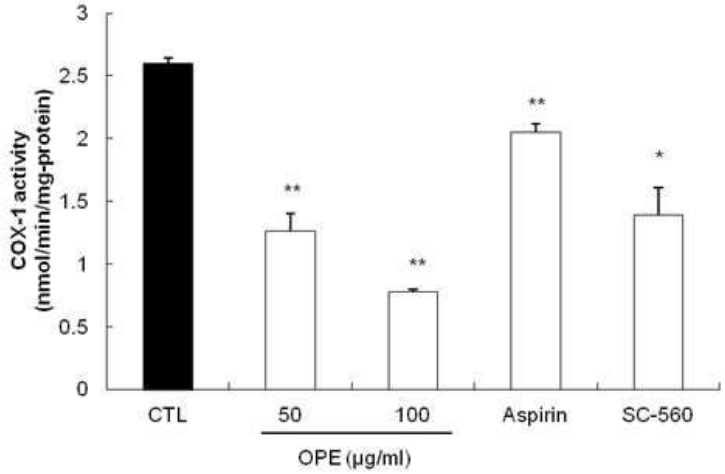
도면4


[Ca2+]i (nM)
Collagen (10 μg/ml)
OPE (μg/ml)
-
50
100
500

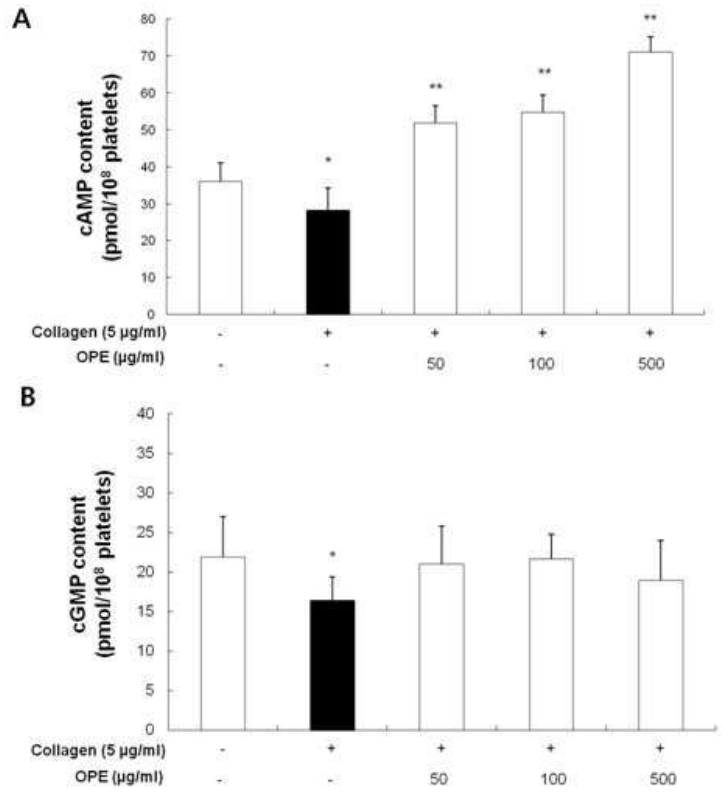
도면5


TXA2 synthase activity
(ng/min/mg-protein)
140
120
100
80
60
40
20
0
CTL
50
100
Ozagrel
OPE (μg/ml)

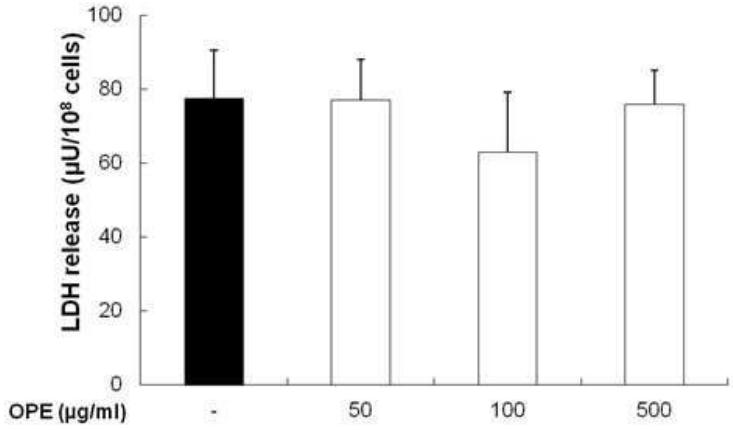
도면6


COX-1 activity
(nmol/min/mg-protein)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
CTL
50
100
Aspirin
SC-560
OPE (μg/ml)

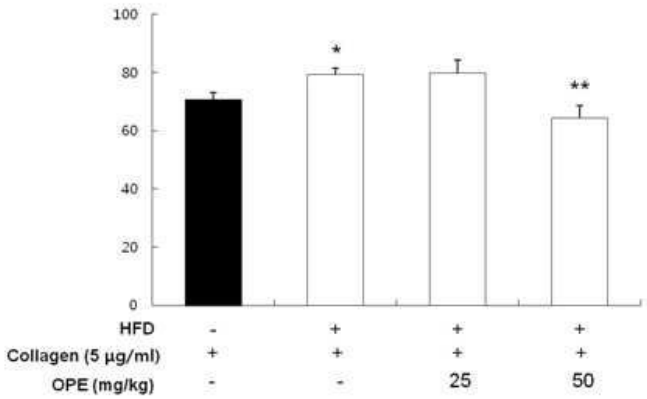
도면7


A
cAMP content (pmol/10⁸ platelets)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
*
**
**
Collagen (5 μg/ml) - + + + +
OPE (μg/ml) - - 50 100 500
B
cGMP content (pmol/10⁸ platelets)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
Collagen (5 μg/ml) - + + + +
OPE (μg/ml) - - 50 100 500

도면8


LDH release (μU/10⁸ cells)
100
80
60
40
20
0
OPE (μg/ml) - 50 100 500

도면9



Inhibition rate (%)	
	15 days
Control	0
50 mg/kg	18.8±2.32*

도면10

