



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0048081
(43) 공개일자 2017년05월08일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 36/537</i> (2006.01) <i>A23L 1/30</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/216</i> (2006.01) <i>A61K 31/352</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 36/537</i> (2013.01)
 <i>A23L 33/105</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0148988
 (22) 출원일자 2015년10월26일
 심사청구일자 없음</p> | <p>(71) 출원인
 한림대학교 산학협력단
 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)</p> <p>(72) 발명자
 이재용
 강원도 춘천시 춘주로 174, 103동 1303호 (퇴계동, 그린타운아파트)
 강영희
 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교 생명과학관 5층 8513호 (옥천동)
 임순성
 강원도 춘천시 후석로 325, 105동 301호 (후평동, 춘천더샵아파트)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인 정안</p> |
|---|--|

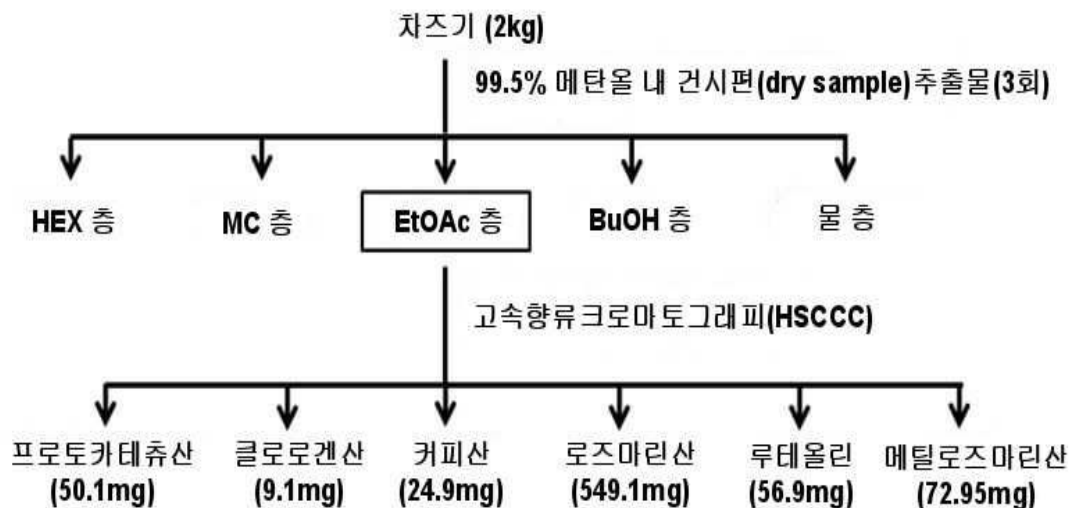
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **혈중 콜레스테롤 감소 및 고지혈증 개선 활성이 우수한 차즈기 유래 페놀릭 물질**

(57) 요약

본 발명은 콜레스테롤 흡수 및 HMG-CoA 환원효소 활성을 저해하여 혈중 콜레스테롤의 농도를 감소시키고, 고지혈증 개선 활성이 우수한 차즈기 유래 페놀릭 물질에 관한 것으로 혈중 콜레스테롤을 감소시키고 고지혈증 개선 활성에 대한 자료를 제공하기 위한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/216 (2013.01)

A61K 31/352 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 112085-3

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 2012 고부가가치식품 기술개발사업

연구과제명 콜레스테롤 대사와 경화성 혈관질환 퇴치를 위한 차즈기 이용 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.08 ~ 2015.08.07

명세서

청구범위

청구항 1

차즈기 용매 추출물을 유효성분으로 포함하는 고지혈증 개선용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 추출물이 건조된 차즈기 잎으로부터의 추출물임을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 차즈기 추출물은 용매 추출법, 초음파 추출법, 초임계 추출법, 발효법 및 포제법에 의한 추출법으로부터 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 수득하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 용매 추출법은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매를 이용한 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 히드록시메틸글루타릴 CoA 환원효소(HMG-CoA)를 억제시키는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 콜레스테롤 감소 및 흡수 저해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 7

차즈기 추출물을 유기용매를 이용하여 분획한 분획물을 함유하는, 고지혈증 개선용 약학 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 유기용매는 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 분획물은 차즈기 추출물을 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 순으로 계통분획하여 얻은 헥산 분획물, 메틸렌클로라이드 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 10

제 7항에 있어서,

상기 차즈기 추출물은 차즈기를 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키고 고지혈증을 개선시키는 활성이 우수한 차즈기 유래 페놀릭 물질을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 차즈기(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo))는 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 일년생 초본으로 중국이 원산지이며, 약용식물로 들어와 각처에서 재배하고 있는 귀화식물로서, 우리나라에서도 전 지역에 걸쳐 자생하며 재배가 어렵지 않다. 봄에 씨를 뿌려 재배하는 차즈기의 줄기에는 성긴 털이 나있고 잎은 꼭지가 길며 가장 자리는 성긴 톱니 모양이다. 여름철에는 줄기 끝 엽액에서 줄기가 나와 연한 자주색의 작은 꽃이 핀다. 잎은 차즈기, 차조기 또는 차죽이라고 부르며, 종자는 소자라고 하며 약재로 사용된다. 차즈기의 잎은 주로 9월 상순에 채취하여 그늘에서 건조한 것이 사용된다. 한방에서는 차즈기의 잎을 소엽이라 불리고, 종자는 소자라 불리며, 주로 발한, 지혈, 해열, 진통, 진정 및 아토피 등의 피부질환에 치료에 사용되고 있다.

[0003] 차즈기의 화학성분으로는 전초에 약 0.5%의 정유성분이 함유되어 있는데, 수면 연장의 작용이 있는 것으로 알려진 페릴라알데하이드(perilla aldehyde)가 정유 성분의 50% 이상을 차지하며, 에센셜 오일, 플라보노이드, 로즈마린산, 스티그마스테롤, 모노테르펜 글리코시드, 청산글리코시드(cyanogenic glycoside), 디글루카노플라본(diglucaonoflavone) 등이 함유되어 있다고 보고되어 있다. 또한 이외에도 차즈기에는 아르기닌, 시아니딘-3,5-β-글루코시드 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 차즈기의 잎은 인체에서 다양한 활성을 가진 여러 종류의 안토시아닌이 다량 함유되어 있다고 보고되어 있다.

[0004] 전 세계적으로 현대인들의 스트레스 가중, 고콜레스테롤 음식섭취, 유전적인 특성으로 인한 고지혈증이 심각한 문제로 대두되고 있다. 고지혈증은 혈관에 콜레스테롤 침착을 유발하여 고혈압, 동맥경화, 심장병, 협심증, 뇌졸중 등 다양한 심장 및 뇌혈관성 질환을 유발하고 전 세계적으로 사망률이 1, 2위를 차지하는 질환으로 보고되었다. 고지혈증을 치료하는 약물인 스타틴이 널리 처방되고 있지만 아직도 더 우수한 고지혈증 치료활성과 부작용이 없는 소재의 발견이 필요한 실정이다.

[0005] 그러나, 당해 기술 분야에서는 항알레르기, 항아토피 피부염 치료에 효과적인 소엽 추출물의 제조방법(한국등록특허 제10-1147970호), 위궤양의 예방 및 치료에 효과가 있는 소엽 추출물의 제조방법(한국등록특허 제10-0353262호), 차조기 추출액 및 이를 이용한 음료(한국등록특허 제10-1127675호) 등의 추출물에 관한 연구만이 이루어졌을 뿐, 차즈기의 혈중 콜레스테롤 감소 및 고지혈증의 개선 활성에 관한 연구는 아직까지 미흡한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추고 고지혈증을 개선하는 활성이 우수한 차즈기 용매 추출물 또는 상기 추출물의 에틸아세테이트(AE) 분획물 내의 페놀릭 물질들을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추고 고지혈증을 개선하는 활성이 우수한 차즈기 용매 추출물 또는 상기 추출물의 에틸아세테이트 분획물 내 페놀릭 물질들을 함유하는 의약품, 음료, 캡슐, 환, 액포 등의 식품 또는 건강 기능성 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물, 및

공정 등이 기재되어 있다. "한 가지 구현예" 또는 "구현예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구현예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현 "한 가지 구현예에서" 또는 "구현예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구현예를 나타내지는 않는다.

- [0009] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0010] 본 발명의 일 구현예에서, 차즈기 용매 추출물 또는 상기 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 혈중 콜레스테롤 감소 및 고지혈증 개선용 차즈기 유래 페놀릭 물질들이 제공된다.
- [0011] 본 발명의 일 구현예에서, 혈중 콜레스테롤을 낮추고, 고지혈증을 개선하는 활성이 우수한 차즈기 용매 추출물 또는 상기 추출물의 에틸아세테이트 분획물 내의 페놀릭 물질인 프로토키테추산, 클로로겐산, 커피산, 로즈마린산, 루테올린, 메틸로즈마린산이 제공된다.
- [0012] 본 발명의 일 구현예에서, 혈중 콜레스테롤을 낮추고, 고지혈증을 개선하는 활성이 우수한 차즈기 용매 추출물 또는 상기 추출물의 에틸아세테이트 분획물 내의 페놀릭 물질을 함유하는 의약품, 음료, 캡슐, 환액포 등의 식품 또는 건강 기능성 식품 조성물이 제공된다.
- [0013] 본 발명에서 용어, "추출물"은 천연물로부터 분리된 활성 성분을 의미하며, 여기서는 차즈기로부터 분리된 물질을 의미한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 침출법 및 환류 추출법 등 당업계의 통상적인 추출 방법일 수 있다. 바람직하게는 환류 추출법을 사용하여 세척 및 건조로 이물질이 제거된 차즈기를 헥산, 메틸렌클로라이드(MC), 에틸아세테이트, 부탄올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 상기 용매들을 순차적으로 시료에 적용하여 추출한 추출물일 수도 있다.
- [0015] 추출 용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물이며, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올이다.
- [0016] 추출 용매의 양은 시료의 중량 기준으로 2 내지 50배를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 2 내지 20배이다. 추출을 위해 시료는 추출 용매에서 침출을 위해 1 내지 72 시간 동안 방치될 수 있으며, 바람직하게는 24 내지 48 시간 동안 방치될 수 있다.
- [0017] 추출 후, 추출물은 새로운 분획 용매를 순차적으로 적용하여 분획할 수 있다. 분획시 사용하는 분획 용매는 물, 알코올, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 헥산이며, 바람직하게는 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 부탄올이다.
- [0018] 상기 분획물에는 에틸아세테이트 분획층 내에 프로토키테추산, 클로로겐산, 커피산, 로즈마린산, 루테올린, 메틸로즈마린산을 함유한다.
- [0019] 추출물 또는 분획물을 얻은 후에는 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에서, 식품 조성물은 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제, 천연 탄수화물, 영양제, 비타민제, 증점제, pH 조절제, 방부제 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 기능성 식품 조성물은 정제, 환제, 과립제, 분말제, 액제, 경질캡셀제, 연질캡셀제 등과 같은 일반적인 제형으로 제조될 수 있으며, 죽, 빵, 음료, 바, 초콜릿, 쿠키, 차, 드링크제, 비타민 복합제, 육류, 소시지, 캔디, 면, 젤리 등과 같은 임의의 형태로 제조될 수 있다.
- [0022] 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 기술 분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명을 통하여 혈중 콜레스테롤 감소 및 고지혈증 개선에 도움을 줄 수 있는 차즈기 추출물 및 에틸아세테이트 분획물 내의 페놀릭 물질들을 이용하여 의약품, 식품 또는 건강 기능성 식품을 제공할 수 있게 됨으로써 농가소득의 증대와 소비자들의 건강증진에 도움을 줄 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 차즈기 추출물 및 분획물의 제조를 나타낸다.
- 도 2는 차즈기 추출물의 장 내피세포(Caco-2) 배양에서 콜레스테롤흡수 저해활성을 나타낸다.
- 도 3은 차즈기 메탄을 추출물의 용매 분획물의 장 내피세포에서 콜레스테롤 흡수저해 활성을 나타낸다.
- 도 4는 차즈기 메탄을 추출물의 용매 분획물의 HMG-CoA 환원효소 억제 활성을 나타낸다.
- 도 5는 고콜레스테롤 식이 SD 랫트에서 차즈기 추출물을 투여한 후 혈중 콜레스테롤 및 TG 농도의 변화를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0026] 가. 차즈기의 추출

- [0027] 건조된 차즈기의 잎과 줄기 2kg을 한약재상에서 구입하여 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 주정(메탄올) 20L로 3회 반복 환류 추출하였다. 추출액을 여과한 후에 여액을 회전 감압 농축기를 이용하여 건조한 추출물을 얻었다. 이를 물에 녹인 후 차례로 용매를 가하여 분액깔때기에서 분획하였다. 용매는 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 부탄올을 사용하였다. 분획물을 감압농축기로 농축건조하여 물 또는 에탄올에 녹여 사용하였다. 에틸아세테이트 분획층 내에 프로토키타추산, 클로로겐산, 커피산, 로즈마린산, 루테올린, 메틸로즈마린산이 존재함을 확인하였다.

[0028] 나. 장 내피세포(Caco-2)에서 차즈기 추출물의 콜레스테롤 흡수저해 활성평가

[0029] 1. 재료 및 방법

- [0030] 장 내피세포(Caco-2)에서의 콜레스테롤 흡수능을 측정하기 위해 6-웰 플레이트에 0.15×10^6 세포/mL가 되도록 세포를 분주하고 4-7일간 배양하였다. 이것을 F-12 배양액(0.1 μ ci/웰 [1,2-³H]-콜레스테롤)과 차즈기 추출물을 넣고, 6시간 동안 배양하였다. 6시간 배양 후, 배양액과 세포 추출물을 모으고 3ml의 울티마 골드 섬광액(Ultima Gold scintillant)을 첨가해 액체섬광(liquid scintillation)을 β -섬광계수기로 측정하였다. 측정 시료는 콜레스테롤 흡수 저해제인 양성 대조군으로 CI976(50 μ g/mL), 중국산과 국산 차즈기의 H₂O, MeOH(5mg/mL) 추출물, 차즈기 추출물의 용매 분획물을 사용하였다.

[0031] 2. 결과

- [0032] 도 2에서 나타나 있듯이 국산 및 중국산 메탄을 추출물이 장 내피세포(Caco-2)배양에서 콜레스테롤 흡수를 저해하는 활성이 우수하였다. 또한 도 3에서 나타나있듯이 차즈기 메탄을 추출물의 에틸아세테이트 분획물과 메틸렌클로라이드 분획물의 장 내피세포에서 콜레스테롤 흡수저해 활성이 우수하였다.

[0033] 다. 차즈기추출물의 용매 분획물의 HMG-CoA 환원효소 저해활성 평가

[0034] 1. 재료 및 방법

- [0035] 차즈기 분획물들이 간에서 콜레스테롤을 합성하는 과정에 있어서 중요한 효소인 HMG-CoA 환원효소의 효소활성을 저해하는지 알아보기 위해 HMG-CoA 환원효소 활성 분석을 통해 확인하였다. HMG-CoA 환원효소 분석 키트를 사용하여 각각의 차즈기 추출물의 분획물들과 양성 대조군인 프라바스타틴에 HMG-CoA 반응 용액을 첨가하여, 효소 반응 시작과 동시에 340nm에서 10분간 30초 간격으로 흡광도의 변화를 확인하여 효소활성을 측정하였다.

[0036] 2. 결과

- [0037] 도 4에 결과가 나타나 있듯이 차즈기 메탄을 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 HMG-CoA 환원효소 효소억제 활성은 거의 100%로 우수한 것으로 나타났다.

[0038] 라. 고콜레스테롤 식이유발 고지혈증 SD 랫트에서 콜레스테롤 저해 활성평가

[0039] 1. 재료 및 방법

- [0040] 1) 시료의 처리 및 식이

[0041] 기본 실험 식이 조성은 일반사료와 1.25% 고콜레스테롤(리서치 다이어트, AIN-93) 식이를 하였고, 처리군은 정상군, 음성대조군, 양성대조군(아토바스타틴(Atrovastatin) 3mg/kg/day), 차즈기 추출물 20mg/kg/day, 차즈기 추출물 100mg/kg/day의 농도로 물에 녹여 존데를 이용하여 매일 경구 투여하였다.

	정상군	음성대조군	양성대조군	시료처리군1	시료처리군2
사료	일반사료	1.25% 콜레스테롤사료(AIN-93)			
처리시료	-	-	아토바스타틴	차즈기 추출물	차즈기 추출물
투여량 (mg/kg/day)	-	-	3	20	100
마리수	10	10	10	10	10
합계 50 마리					

[0042]

[0043] 2) 실험동물의 사육 및 체중, 음용수 섭취량, 사료섭취량의 측정

[0044] 실험동물은 최적조건(온도 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$, 명암주기 07:00~19:00)에서 예비 사육한 외관상 건강한 평균 체중 $150 \pm 10\text{g}$ 의 스프래그-다워리(Sprague Dawley, SD) 수컷 흰쥐를 난파법에 의해 10마리씩 5개의 군으로 나누고 4주간 사육하였다. 매주 체중, 음용수 섭취량 및 사료 섭취량을 측정하였다.

[0045] 3) 혈액생화학 분석

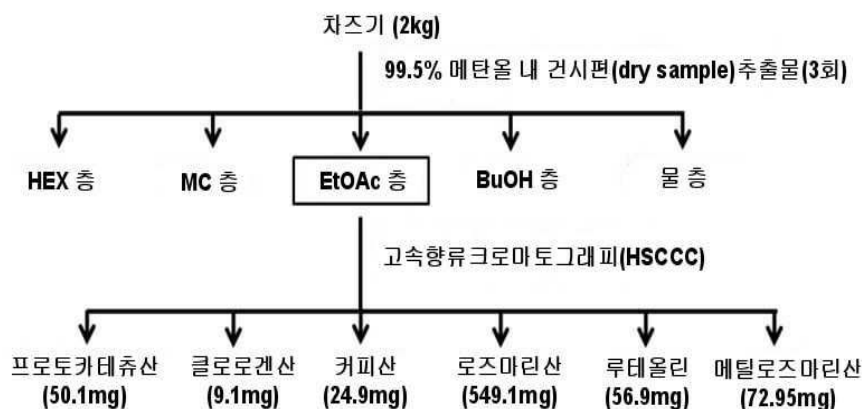
[0046] 4주간 사육 후 실험종료 전 실험동물을 16시간 절식시키고 CO_2 마취시킨 후 경추 탈골법에 의하여 도살하고, 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 혈청 시료는 분석 전까지 -70°C 냉동고에서 보관하였다. 모든 마우스는 혈액 채취 전 12시간 동안 금식하고, 혈액은 안와정맥에서 채취하였다. 혈액은 3000rpm에서 15분 원심분리하여 혈청을 -20°C 에 보관하였다. 혈청내의 트리아실 글리세롤(TG), HDL 전체 콜레스테롤을 ELISA 키트(아산제약, 서울, 한국)로 측정하고 LDL 콜레스테롤은 위의 값으로부터 계산하였다.

[0047] 2. 결과

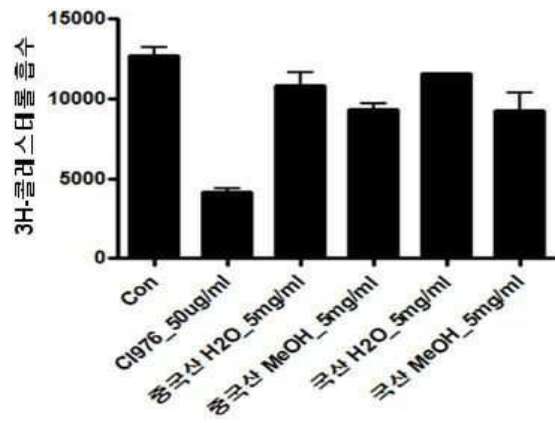
[0048] 도 5의 결과에 나타나있듯이 고콜레스테롤 식이 유발 고지혈증 SD 랫트에서 차즈기 추출물 투여 후 혈중 콜레스테롤의 농도를 측정한 결과 차즈기 추출물 100mg/kg/day 투여군에서 아토바스타틴의 수준으로 혈중 LDL-콜레스테롤의 농도를 약 30% 정도 감소시켰다. 또한 차즈기 추출물 투여군에서 혈중 TG농도를 약 50% 정도 감소시켰다.

도면

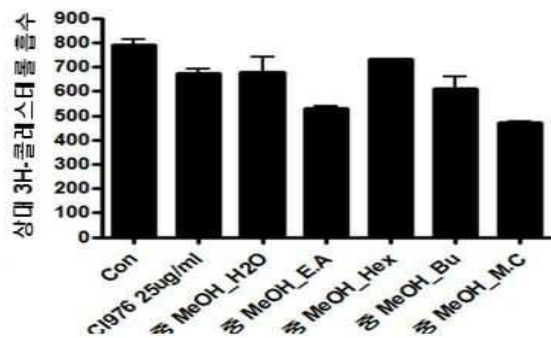
도면1



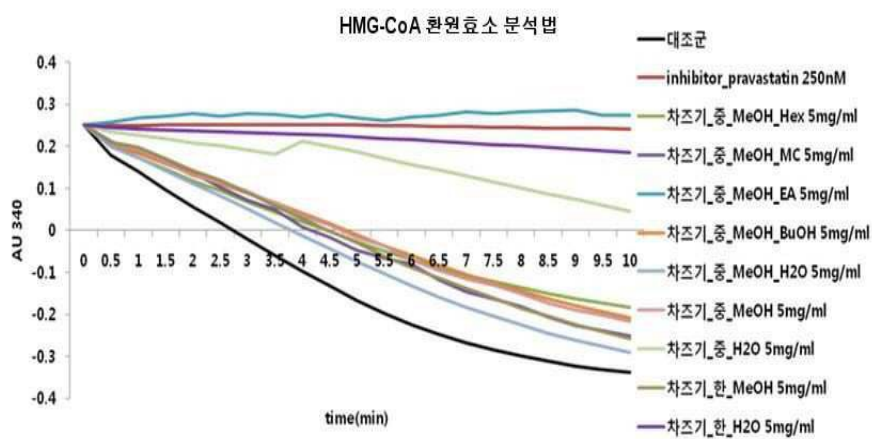
도면2



도면3



도면4



도면5

