(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0123612
(43) 공개일자 2020년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/8962 (2006.01) *A23L 2/38* (2006.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 36/739* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/8962 (2013.01)
A23L 2/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0046700
(22) 출원일자 2019년04월22일
심사청구일자 2019년04월22일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
강일준
강원도 춘천시 삭주로 89-7 , 107동 503호(후평동, 에리트아파트)
(74) 대리인
김남혁

전체 청구항 수 : 총 12 항

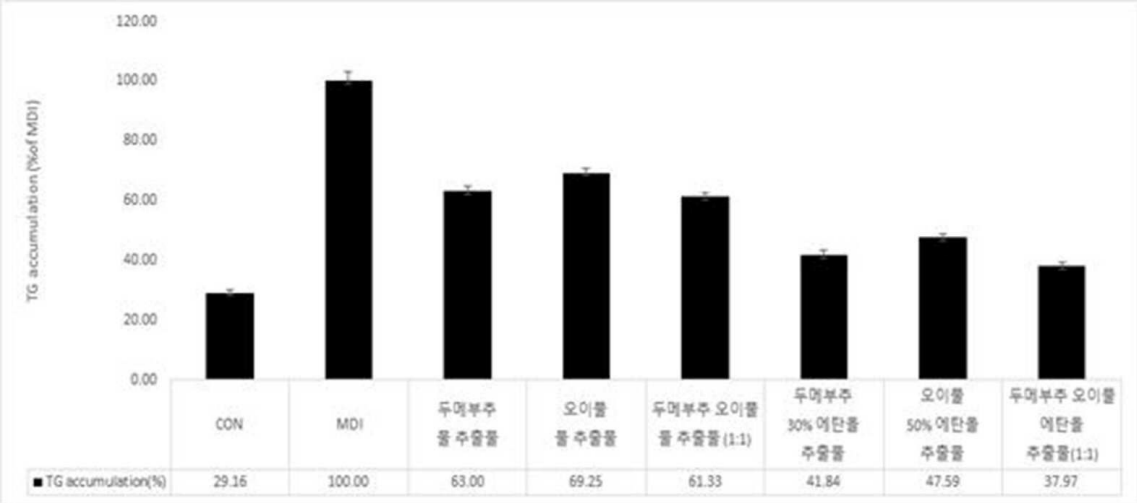
(54) 발명의 명칭 **두메부추 및 오이풀 추출물의 제조방법 및 상기 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 두메부추와 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 약학 조성물, 건강기능식품 조성물, 음료 조성물, 및 두메부추와 오이풀 추출물의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 약학 조성물, 건강기능식품 조성물, 및 음료 조성물은 두메부추와 오이풀의 복합사용에 의한 시너지 효과에 의해, 뛰어난 지방 생성 억제 효과, 체중 및 체지방 감소 효과, 및 혈중 지질 수치 개선 효과를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/739 (2013.01)
A61P 3/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2200/3262 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

두메부추 및 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 두메부추 및 오이풀 추출물은 각각 물 및 주정 에탄올을 용매로 추출 후 1:1 중량 비율로 혼합한 것을 특징으로 하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 두메부추와 오이풀 추출물은 3:7~7:3의 중량비로 혼합한 두메부추와 오이풀 혼합물을 물 및 C1 내지 C4의 직쇄 또는 분지쇄형 알코올로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 후, 상기 추출물을 물, 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 부탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 분획하여 얻어지는 것임을 특징으로 하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 비만으로부터 유도된 대사증후군이 고지혈증, 당뇨병, 고혈압 및 동맥경화 중에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 위내투여를 위한 고형 제제로서 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제로 제조되거나, 액상제제로서 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제로 제조되는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 책색제, 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유시간, 보호성 콜로이드 증점제, PH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 및 탄산화제 중 선택된 어느 하나의 성분 또는 둘 이상의 성분을 더 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 7

두메부추 및 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 두메부추와 오이풀 추출물은 3:7~7:3의 중량비로 혼합한 두메부추와 오이풀 혼합물을 물 및 C1 내지 C4의 직쇄 또는 분지쇄형 알코올로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 것임을 특징으로 하는

비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

두메부추 및 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 개선용 음료 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 두메부추 및 오이풀 추출물은 3:7~7:3의 중량비로 혼합한 두메부추와 오이풀 혼합물을 물 및 C1 내지 C4의 직쇄 또는 분지쇄형 알코올로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 것임을 특징으로 하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 개선용 음료 조성물.

청구항 11

(a) 두메부추(뿌리, 꽃 제외)에 각각 20배의 물 또는 주정 (0~50% 에탄올)을 용매로 하고 15~100℃에서 1~10시간 동안 추출하는 단계; 및

(b)오이풀(뿌리, 꽃 제외)에 각각 20배의 물 또는 주정 (0~50% 에탄올)을 용매로 하고 15~100℃에서 1~10시간 추출하는 단계; 및

(c) 상기 (a),(b)단계에서 얻어진 추출액을 50℃ 이하에서 감압 농축하여 농축액 상태의 추출물을 얻거나, 건조하여 분말상의 추출물을 얻는 단계;를 포함하는 두메부추와 오이풀 추출물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 두메부추와 오이풀은 1:9~9:1의 중량비로 혼합된 것임을 특징으로 하는 두메부추와 오이풀 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인해 체내 지방이 과잉 축적되어 있는 상태를 말하며, 원인으로는 서구화된 식생활, 내분비 장애, 유전적 요인 등이 있다. 비만 그 자체만으로도 건강에 문제가 되지만, 제 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등과 같은 대사증후군을 일으키는 요인으로도 문제가 되고 있다.

[0004] 최근 현대인들의 생활수준이 향상되면서 전 세계적으로 비만 및 대사질환 환자가 급격히 증가하여 사회적 문제가 되고 있다. 2016년 국민건강영양조사에 따르면, 우리나라의 비만 유병률은 42.3%로 이는 2015년 39.7%에 비해 2.6%나 증가하였다.

[0005] 비만에 대한 예방 및 치료법으로는 식습관 개선과 주기적인 운동이 요구되고 있지만, 현대인의 특성상 비만억제를 위한 주요 노력은 비만치료제 약물과 건강보조 식품에 초점이 맞춰져 있다.

[0006] 비만을 개선하기 위한 약물로서는 식욕을 억제하는 시부트라민(sibutramine)과 체내의 리파아제(lipase)를 억제하여 지방의 흡수를 감소시키는 올리스타트(orlistat)가 있다. 그러나 시부트라민의 경우, 두통, 구강건조, 불면증, 고혈압 등의 부작용이 있고, 올리스타트의 경우 복통, 설사, 지방변, 분실금 등의 부작용이 있다.

[0007] 이에 따라 최근 비만의 예방과 치료를 위해 안전하면서도 대사증후군 예방도 효과적인 약물에 대한 관심이 증

가하고 있으며, 특히 부작용이 적은 천연물을 이용한 치료제를 찾고자하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

[0008] 그러나 인체에 안전하며 효과적인 천연물을 이용한 비만 및 대사증후군 예방 및 치료제는 아직 개발되지 못하고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은, 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서,

[0011] 두메부추와 오이풀의 복합사용에 의한 시너지 효과에 의해, 뛰어난 지방 생성 억제 효과, 체중 및 체지방 감소 효과, 및 혈중 지질 수치 개선 효과를 제공하며, 천연물을 유효성분으로 사용함으로써 인체에 안전한 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 조성물, 건강기능식품 조성물, 및 음료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 두메부추와 오이풀로부터 비만과 비만으로부터 유도된 대사증후군에 우수한 효과를 제공하는 기능성분을 효과적으로 추출할 수 있는 두메부추와 오이풀 추출물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기의 목적을 달성하기 위하여,

[0015] 본 발명은 두메부추와 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은

[0017] 두메부추와 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은

[0019] 두메부추와 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 개선용 음료 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은

[0021] (a) 두메부추(뿌리, 꽃 제외)에 각각 20배의 물 또는 주정 (0~50% 에탄올)을 용매로 하고 15~100℃에서 1~10시간 동안 추출하는 단계; 및

[0022] (b)오이풀(뿌리, 꽃 제외)에 각각 20배의 물 또는 주정 (0~50% 에탄올)을 용매로 하고 15~100℃에서 1~10시간 추출하는 단계; 및

[0023] (c) 상기 (a),(b) 단계에서 얻어진 추출액을 50℃ 이하에서 감압 농축하여 농축액 상태의 추출물을 얻거나, 건조하여 분말상의 추출물을 얻는 단계를 포함하는 두메부추와 오이풀 추출물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 조성물, 건강기능식품 조성물, 및 음료 조성물은 두메부추와 오이풀의 복합사용에 의한 시너지 효과에 의해, 뛰어난 지방 생성 억제 효과, 체중 및 체지방 감소 효과 및 혈중 지질 수치 개선 효과를 제공한다.

[0026] 또한, 천연물을 유효성분으로 사용함으로써 인체에 대한 독성 없이 안전하게 사용할 수 있는 효과를 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명의 두메부추와 오이풀 추출물의 제조방법은 두메부추와 오이풀로부터 비만과 비만으로부터 유도된

대사증후군에 우수한 효과를 제공하는 기능성분을 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 실험예 2에서 수행된 3T3-L1 지방세포에서 Oil red O 염색을 통한 TG(중성지방) 함량 측정결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 실험예 3의 2에서 수행된 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스의 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 실험예 3의 2에서 수행된 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스의 장기무게 측정결과(지방증가 측정결과)를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실험예 3의 3에서 수행된 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스의 혈액생화학적 검사 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0031] 본 발명은 두메부추와 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0032] 상기 두메부추와 오이풀 추출물은 각각 물 및 주정 에탄올을 용매로 추출 후 1:1 중량비로 혼합한 것이 사용될 수 있다.

[0033] 또한, 상기 두메부추와 오이풀 추출물은 1:9~9:1의 중량비로 혼합한 두메부추와 오이풀 혼합물을 물 및 C1 내지 C4의 직쇄 또는 분지쇄형 알코올로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 후, 상기 추출물을 물, 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 부탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 분획하여 얻어지는 것이 사용될 수 있다.

[0034] 상기 비만으로부터 유도된 대사증후군은 고지혈증, 당뇨병, 고혈압 및 동맥경화 중에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0035] 본 발명의 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 치료용 조성물은 두메부추와 오이풀 혼합 추출물 외에 다른 유효성분 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 더 포함할 수 있다.

[0036] 즉, 본 발명의 약학 조성물은 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0037] 상기 조성물 내의 상기 두메부추와 오이풀 추출물의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50중량%인 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0038] 상기 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0039] 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 위내투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도 한 가지 이상의 부형제 및/또는 윤활제 등을 포함할 수 있다. 위내투여를 위한 액상 제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.

[0040] 상기 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다

르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 보다 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분을 기준으로 1일 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg으로 하는 것이 좋으나 이에 제한되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 유효성분의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명은 또한,

[0043] 두메부추와 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0044] 상기 두메부추와 오이풀 추출물은 위에서 기술한 것과 동일한 것이 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 상기 건강기능식품 조성물은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 식품 첨가제 등을 모두 포함하는 의미로 사용된다. 상기 식품의 예로서 각종 식품류, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0046] 상기 건강기능식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0047] 또한, 상기 식품에 있어서, 상기 두메부추와 오이풀 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있다.

[0050] 본 발명은 또한,

[0051] 두메부추와 오이풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 및 비만으로부터 유도된 대사증후군의 예방 및 개선용 음료 조성물에 관한 것이다.

[0052] 상기 두메부추와 오이풀 추출물은 위에서 기술한 것과 동일한 것이 사용될 수 있다.

[0053] 상기 음료 조성물은 각종 음류와 음료 첨가제를 포함하며, 상기 두메부추와 오이풀 추출물은 음료의 전체의 부피 100 ㎖ 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 상기 음료 조성물은 음료 첨가제를 포함하는 개념이다.

[0056] 본 발명은 또한,

[0057] (a) 두메부추(뿌리, 꽃 제외)에 각각 20배의 물 또는 주정 (0~50% 에탄올)을 용매로 하고 15~100℃에서 1~10시간 동안 추출하는 단계; 및

[0058] (b)오이풀(뿌리, 꽃 제외)에 각각 20배의 물 또는 주정 (0~50% 에탄올)을 용매로 하고 15~100℃에서 1~10시간 추출하는 단계; 및

[0059] (c) 상기 (a),(b)단계에서 얻어진 추출액을 감압 농축하여 농축액 상태의 추출물을 얻거나, 건조하여 분말상의 추출물을 얻는 단계;를 포함하는 두메부추와 오이풀 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

[0060] 상기에서 건조는 동결 건조 방식으로 수행될 수 있다.

[0061] 상기 두메부추와 오이풀은 1:1의 중량비로 혼합된 것이 사용될 수 있다.

[0062] 상기 (a)단계의 추출은 2회 이상 반복적으로 실시될 수 있다.

[0064] 본 발명에서 상기 비만 예방 및 개선 효과는 하기 실시예 및 실험예 에서 in vitro 시험으로 3T3-L1 지방전구세포에서 지방 생성 및 축적 억제를 통해 항비만 가능성을 확인한 후, in vivo 시험으로 C57BL/6J 마우스에서 체중 및 체지방 감소와 혈중 지질 수치 감소를 통해 입증되었다.

[0065] 구체적으로, 본 발명에 따른 두메부추와 오이풀 에탄올 추출 혼합물은 3T3-L1세포에서 가장 우수한 지방 축적 억제 효과를 갖는 것으로 확인되었다(표 1). 전구지방세포인 3T3-L1은 여러 호르몬과 다양한 전사인자들에 의해 지방세포로 분화되면서 세포내에 지방을 축적한다. 두메부추와 오이풀 에탄올 추출 혼합물을 3T3-L1에 처리하였을 때 지방세포로의 분화를 억제하므로 두메부추와 오이풀 에탄올 추출 혼합물은 비만 예방과 치료 목적으로 이용될 수 있다.

[0066] 본 발명에 따른 두메부추와 오이풀 에탄올 추출 혼합물은 C57BL/6J 마우스에서 체중의 감소 효과를 갖는 것으로 나타났다(표 2). 시험군은 ND(Normal Diet)군, HFD(High Fat Diet)군, HFD+D100(두메부추100 mg/kg)군, HFD+S100(오이풀 100 mg/kg)군, HFD+DS100(두메부추+오이풀 에탄올 추출 혼합물 100 mg/kg)군으로 나누었다. 시험 기간 동안 체중을 측정하였고, 시험 종료 후 장기를 해부하였다. HFD군과 비교하였을 때 HFD+DS100군의 체중이 가장 많이 감소되었고, HFD+D100군과 HFD+S100군이 다음으로 감소되었다.

[0067] 부고환 및 내장 지방의 무게도 HFD+DS100군이 가장 많이 감소되고, 다음으로 HFD+D100군과 HFD+S100군이 감소되어, 체중과 비슷한 경향을 보였다(표 3). 따라서 두메부추와 오이풀 에탄올 추출 1:1 혼합물 은 체중과 체지방 감소 효과가 우수함을 확인하였다.

[0068] 본 발명에 따른 두메부추와 오이풀 추출물을 투여한 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청 내 triglycerides(TG), total cholesterol(TC), high density lipoprotein-cholesterol(HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol(LDL-C) 농도를 측정하였을 때, TG, TC, LDL-C 수치 모두 ND군을 제외하고 HFD+DS100군이 가장 낮았고, 다음으로 HFD+D100군과 HFD+S100군이 낮았다(표 4). 이를 통해 두메부추와 오이풀 에탄올 추출 혼합물은 혈청 지질 수치를 개선함으로써 고지혈증 등 비만과 관련된 대사증후군 예방과 치료 목적으로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0069] 이하에서, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다. 하기의 실시예는 본 발명의 범위 내에서 당업자에 의해 적절히 수정, 변경될 수 있다.

[0071] **<재료 준비>**

[0072] 두메부추(Allium senescens)는 국산(경상북도 상주시)을 구입하였고, 오이풀도 국산(강원도 인제군)을 구입하였다.

[0074] **<통계처리>**

[0075] 본 발명의 실험에서 모든 자료의 통계분석은 SPSS 통계 프로그램(17.0, Statistical Package for Social Science Inc., USA)을 이용하여 분석하였으며, 분석결과는 실험군당 평균과 표준오차로 나타냈다. 처리군 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0078] **실시예 1: 두메부추 및 오이풀 추출물의 제조**

[0079] 본 발명의 두메부추 추출물은 뿌리와 꽃을 제외시킨 분말화 된 두메부추 무게 1000g의 20배의 물 또는 주정(0~50% 에탄올)을 가하고 15~100℃에서 1~10시간 동안 추출 후 이를 여과하여 추출액을 얻는다. 얻어진 추출액

을 50℃ 이하에서 감압 농축한 후 -70℃에서 예비건조 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물을 얻는다.

[0080] 본 발명의 오이풀 추출물은 건조된 오이풀(뿌리와 꽃 제외)을 작은 입자로 분말화 한 후 오이풀 무게 1000g의 20배의 물 또는 주정 (0~50% 에탄올)을 용매로 하고 15~100℃에서 1~10시간 추출 후 이를 여과하여 추출액을 얻는다. 얻어진 추출액을 50℃ 이하에서 감압 농축한 후 -70℃에서 예비건조 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물을 얻는다.

[0081] 3T3-L1세포에는 두메부추와 오이풀 추출물을 완충액 또는 DMSO에 용해하여 처리하였고, C57BL/6J 마우스에는 생리식염수에 용해하여 현탁액 상태로 경구 투여하였다.

[0084] **실험예 1: 3T3-L1 지방전구세포 배양/분화 및 세포생존능력 측정**

[0085] 3T3-L1 지방전구세포(ATCC, Manassas, VA, USA)는 10% Bovin calf serum(BCS, Gibco, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin(P/S, Gibco, Grand Island, NY, USA) 이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Lonza, Allendale, NJ, USA)을 사용하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

[0086] 지방세포 분화는 24 well plate에 1×10^5 cell/mL의 밀도로 seeding 한 후 100% confluent 상태로 되면 2일간 더 유지하였다. 2일 후 0.5 mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 μM Dex(dexamethasone, Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 μg/mL Insulin(Gibco, Grand Island, NY, USA, MDI solution)을 포함하는 10% fetall bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) DMEM 배지로 2일 동안 분화를 유도하였다. 2일 후 10 μg/mL Insulin을 포함하는 10% FBS DMEM 배지로 2일 간 더 유지하고, 그 후 2일마다 4일 동안 10% FBS DMEM 배지로 교환하였다. 두메부추와 오이풀 추출물은 분화유도물질(MDI solution)을 처리할 때부터 첨가하였고, 분화유도물질을 첨가하지 않은 것을 Control로 하였다.

[0087] 두메부추와 오이풀 추출물들의 첨가농도는MTT tetrazolium을 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용한 시험법인 MTT assay를 통해 세포생존능력 시험을 실시하여 결정하였다. 3T3-L1 지방전구세포에 두메부추와 오이풀 추출물 또는 혼합물을 100, 200, 300 μg/mL 농도로 처리한 후 세포생존능력을 측정한 결과, 모든 시험군이 대조군과 비교하였을 때 세포생존률이 통계학적으로 유의적인 차이를 나타나지 않았으므로 300 μg/mL까지는 독성이 없는 것으로 확인되었다. 따라서 세포 생존률에 이상이 없는 농도범위(300 μg/mL) 이내에 있는 100 μg/mL의 농도에서 모든 시험을 실시하였다.

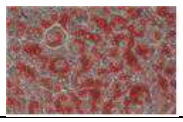
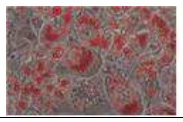
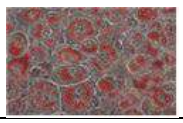
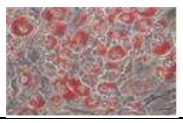
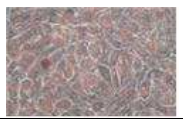
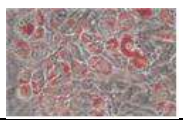
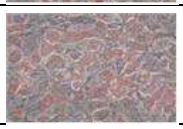
[0089] **실험예 2: Oil red O 염색을 통한 TG 함량 측정**

[0090] 본 실시예 2에서는 3T3-L1세포의 분화에서 형성되는 중성지방을 특이적으로 염색시키는 Oil Red O 용액을 통해 두메부추와 오이풀 추출물의 지방세포 분화 및 지방생성 억제를 확인하였다. 상기 실험예 1에서 분화 종료 후 배지를 제거하고 PBS (Posphate Buffered Saline)로 2회 세척한 후 4% formaldehyde로 40분 동안 상온에서 고정하였다. 고정 후 60% isopropanol로 세척하고 0.2% oil red O(dissolved in 60% isopropanol)으로 20분 동안 상온에서 염색하였다. 염색 후 증류수로 세척한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 염색한 세포는 isopropanol로 용해한 다음 ELISA reader기를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0091] 상기 얻어진 결과, 즉 3T3-L1 지방세포에서 Oil red O 염색을 통한 TG(중성지방) 함량 측정결과를 하기 표 1에 나타내었다. 두메부추와 오이풀 물 추출물의 혼합물과 두메부추와 오이풀 에탄올 추출물의 혼합물은 100 μg/mL 농도에서 MDI(100%)와 비교하였을 때 중성지방축적률이 각각 61%와 37%로 현저히 감소한 것으로 나타났다. 이를 통해 두메부추와 오이풀 에탄올 추출 혼합물은 지방세포로의 분화와 중성지방의 생성을 억제하는 효과가 매우 우수한 것으로 확인되었다.

표 1

[0093]

sample (100㎍/㎖)	TG accumulation (%)	stained lipid droplets using Oil Red O
Control	29.16±1.18[g]	
MDI	100±3.31[a]	
두메부추 물 추출물	63.00±1.96[c]	
오이풀 물 추출물	68.25±1.58[b]	
두메부추 및 오이풀 물 추출물 혼합물(1:1)	61.33±1.27[c]	
두메부추 30% EtOH 추출물	41.84±1.44[e]	
오이풀 50% EtOH 추출물	47.59±1.36[d]	
두메부추 및 오이풀 에탄올 추출 혼합물 (1:1)	37.97±1.05[f]	

[0094] 주) 상기 표 1에서 각 값은 평균±SD (n=9)로 표현되었다.

[0095] 다른 어깨글자를 가진 값들은 P<0.05 에서 유의적으로 다르다.

[0096] 대조군 : 분화되지 않은 지방선구세포, MDI : 분화된 지방세포

[0098] **실험예 3: 동물실험**

[0099] **1. 동물실험설계**

[0100] 5주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)의 수컷 C57BL/6J 마우스를 중앙실험동물(주)(Jung-Ang Lab. Animal, Inc, Seoul, Korea)를 통하여 공급받아 사용하였다. 식이는 일반식이(10% kcal fat)와 고지방식이(60% kcal fat)를 공급하였다. 마우스는 각 군당 12마리씩, 총 5군으로 나누었다. 즉, ND군(10% kcal fat 식이를 공급받는 Normal Diet군), HFD군(60% kcal fat 식이를 공급받는 High Fat Diet군), HFD+D100군(60% kcal fat식이와 두메부추 30% 에탄올 추출물 100 mg/kg 공급받는 시험군), HFD+S100군(60% kcal fat식이와 오이풀 50% 에탄올 추출물 100 mg/kg 공급받는 시험군), HFD+DS100군(60% kcal fat식이와 두메부추 및 오이풀 에탄올 추출물을 각각 50 mg/kg씩 총 100 mg/kg 공급받는 시험군)으로 나누었다. 2주간 고지방식이를 공급하여 비만을 유도한 후 8주간 각 추출물을 위내 투여하였으며, 각 투여물질은 증류수에 녹여 매일 1회 동일한 시간에 투여하였고, 대조군에는 증류수만 투여하였다.

[0101] 실험동물은 온도 20.9~22.6℃, 상대습도 45~55%, 환기회수 및 방식 10~15회/시간, 전배기방식, 조명시간 12시간(08:00~20:00) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(278×420×200 mm, ㈜

쓰리샤인, 금산)에 4마리씩 수용하였다.

[0102]

[0103] **2. 체중 변화, 식이섭취량, 장기무게 측정**

[0104] **(1) 실험 내용**

[0105] 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스를 이용하여 두메부추와 오이풀 추출물의 체중 및 체지방 감소 효과를 확인하였다. 체중과 식이섭취량을 주 1회 측정하였고, 시험기간 종료 후 해부하여 부고환지방 및 내장지방무게를 측정하였다.

[0107] **(2) 체중 변화 및 식이섭취량 측정 결과**

[0108] 상기 얻어진 결과, 즉 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스의 체중 변화 및 칼로리 섭취량 측정 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 체중증가량은 HFD군이 가장 크고, HFD+S100군과 HFD+D100군이 다음으로 크며, HFD+DS100군이 ND군(정상식이 대조군) 다음으로 체중증가량이 작았으므로 본 발명의 두메부추와 오이풀 에탄올추출 혼합물의 체중 감소 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

[0109] 칼로리 섭취량은 ND군을 제외한 나머지 군은 통계학적 유의성이 없었으며, 이를 통해 두메부추와 오이풀 추출물이 식욕을 억제하는 것 보다 지방 합성을 억제하거나 지방 분해를 촉진하는 것으로 예측되었다.

표 2

[0112]

parameters	Groups				
	ND	HFD	HFD+D100	HFD+S100	HFD+DS100
initial body weight (g)	21.78 ±1.46[a]	21.88 ±1.62[a]	21.53 ±0.65[a]	21.66 ±0.58[a]	21.77 ±0.54[a]
final body weight (g)	29.66 ±1.97[d]	45.02 ±4.06[a]	35.82 ±3.95[bc]	38.19 ±4.45[b]	33.78 ±2.94[c]
body weight gain (g)	7.87	23.13	14.29	16.52	12.01
HFD 기준 체중 증가 %	34%	100%	61%	71%	51%
Food intake (g/day)	2.78 ±0.29[a]	2.83 ±0.18[a]	2.84 ±0.17[a]	2.83 ±0.24[a]	2.85 ±0.29[a]
Calorie intake (kcal/day)	10.67 ±1.11[b]	14.85 ±0.92[a]	14.92 ±0.88[a]	14.81 ±1.26[a]	14.96 ±1.52[a]
Water intake (g/day)	3.67 ±0.97[a]	3.08 ±0.21[a]	3.24 ±0.71[a]	3.69 ±0.87[a]	3.16 ±0.27[a]

[0113] 주) 상기 표 2에서 다른 어깨글자를 가진 값들은 $P<0.05$에서 유의적으로 다르다.

[0115] **(3) 장기무게 측정 결과**

[0116] 시험기간 종료 후 측정한 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스의 장기무게 측정결과를 하기 표 3에 나타내었다. 주요장기인 신장, 비장 및 간 무게는 모든 시험군간 통계학적 유의성이 없었다. 이는 세포생존시험의 결과와 마찬가지로 투여한 모든 시료의 독성이 마우스에서도 없다는 것을 반영하고 있다고 할 수 있다. 반면 부고환 및 내장 지방의 무게는 HFD+DS100군이 가장 많이 감소되고, 다음으로 HFD+D100군과 HFD+S100군이 감소되어, 체

중과 비슷한 경향을 보였다. 따라서 두메부추와 오이풀 에탄올 추출물의 혼합물이 체지방 감소 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

표 3

[0117]

parameters	Groups				
	ND	HFD	HFD+D100	HFD+S100	HFD+DS100
Liver (g)	1.13±0.28^{a}	1.29±0.31^{a}	1.16±0.25^{a}	1.18±0.34^{a}	1.15±0.25^{a}
Kidney (g)	0.32±0.03^{a}	0.33±0.03^{a}	0.31±0.03^{a}	0.32±0.03^{a}	0.32±0.03^{a}
Spleen (g)	0.06±0.01^{a}	0.07±0.01^{a}	0.06±0.01^{a}	0.07±0.02^{a}	0.06±0.01^{a}
Epididymal fat (g)	0.53±0.09^{d}	2.59±0.38^{a}	1.55±0.29^{c}	1.88±0.20^{b}	0.63±0.22^{c}
HFD 기준 부고환 지방 증가 %	20%	100%	60%	73%	53%
Visceral fat (g)	0.20±0.04^{d}	1.16±0.43^{a}	0.73±0.21^{c}	0.85±0.15^{b}	0.63±0.22^{c}
HFD 기준 내장 지방 증가 %	17%	100%	63%	73%	54%

[0118] 주) 상기 표 3에서 다른 어깨글자를 가진 값들은 P<0.05에서 유의적으로 다르다.

[0120] **3. 혈액생화학적 검사**

[0121] 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스의 혈액을 이용하여 두메부추와 오이풀 에탄올 추출물의 지질 대사 개선 효과를 확인하였다. 실험종료 후 마우스로부터 채취한 혈액을 분리하고, 혈청으로 혈액 생화학 분석기기(FUJI DRI-CHEM NX500I, FUJIFILM)를 이용하여 triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C)을 측정하였다.

[0122] 상기 얻어진 고지방 식이로 유도된 C57BL/6J 마우스의 혈액생화학적 검사 결과를 하기 표 4에 나타내었다. 혈액 내 TG, TC 농도는 HFD+DS100군이 ND군 다음으로 낮았고, HFD+D100군과 HFD+S100군도 HFD군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 혈액 내 HDL-C 농도는 HFD+DS100군이 가장 높았으며, LDL-C 농도는 ND군 다음으로 HFD+DS100군이 가장 낮았고, HFD+D200군과 HFD+S100군이 그 다음 낮았으나 두 군은 서로 통계학적으로 유의적인 차이가 없었다. 혈관에 쌓인 불필요한 콜레스테롤을 간으로 운반하는 HDL-C은 두메부추와 오이풀 에탄올추출 혼합물을 제공한 군에서 유의적으로 증가하였으며, 혈관에 쌓여 동맥경화를 유발하는 LDL-C는 두메부추와 오이풀 에탄올추출 혼합물을 제공한 군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 두메부추와 오이풀 에탄올추출 혼합물은 TG, TC, 및 LDL-C를 감소시키고 HDL-C은 증가시켜 혈중 지질수치를 개선하고, 이를 통해 고지혈증을 비롯해 심혈관 질환의 발병 위험률을 낮출 수 있음을 확인하였다.

표 4

[0124]

Serum	Groups				
	ND	HFD	HFD+N100	HFD+G100	HFD+NG100
TG (mg/dL)	73.72±4.31^{d}	145.34±6.14^{a}	91.49±4.44^{b}	91.61±3.76^{b}	82.49±4.53^{c}
TC (mg/dL)	155.96±7.29^{c}	249.24±6.18^{a}	219.21±7.99^{b}	221.89±7.67^{b}	218.90±8.76^{bc}
HDL-C (mg/dL)	141.49±3.24^{d}	188.63±7.71^{bc}	193.68±6.65^{b}	192.04±7.29^{b}	199.43±6.55^{a}
LDL-C (mg/dL)	12.51±0.76^{d}	36.46±6.55^{a}	22.89±6.94^{b}	23.93±2.89^{b}	16.85±5.77^{c}

[0125] 주) 상기 표 4에서 다른 어깨글자를 가진 값들은 P<0.05에서 유의적으로 다르다.

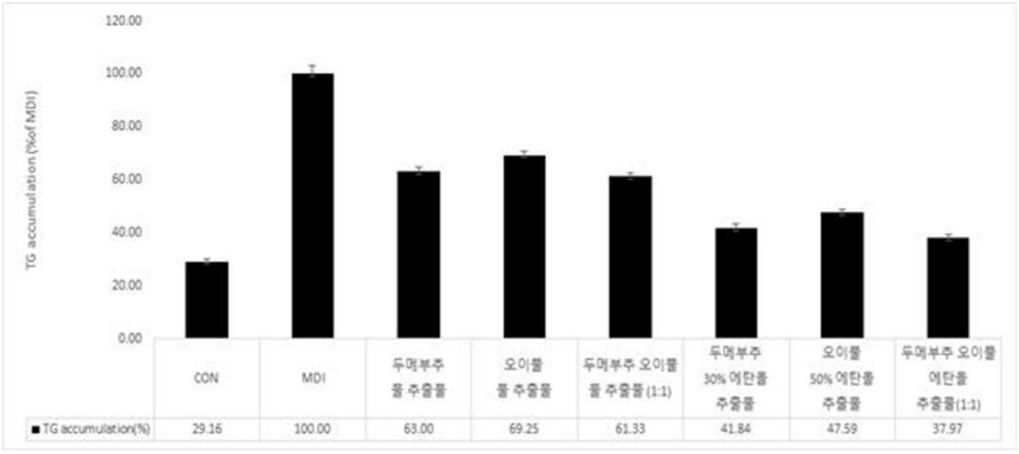
[0127] **<실험결과 종합 평가>**

[0128] 상기 실험결과를 종합해보면, 본 발명의 두메부추와 오이풀 에탄올추출 혼합물은 3T3-L1 세포에서 지방 생성 및 축적 억제 효과가 MDI와 비교하여 매우 현저하였으며, 두메부추 또는 오이풀 각각의 추출물과 비교했을 때도 매우 우수한 것으로 확인되었다. 또한, C57BL/6J 마우스에서 체중 및 체지방 감소와 혈청 지질 수치 개선 효과에 있어서도 두메부추 또는 오이풀 각각의 추출물과 비교하여 매우 우수한 효과를 나타내었다.

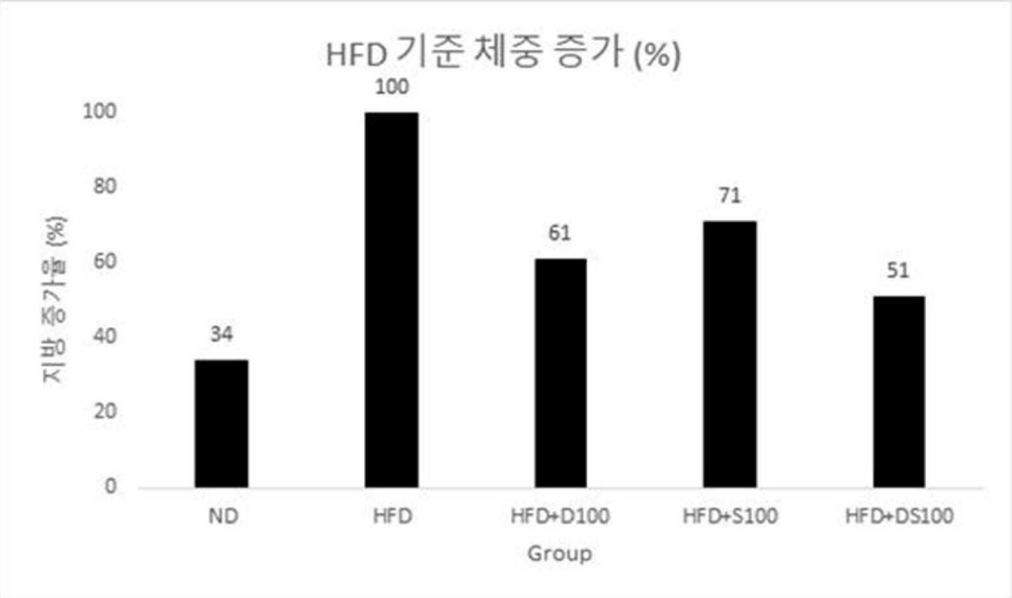
[0129] 그러므로, 본 발명의 두메부추 및 오이풀 에탄올추출 혼합물은 비만 및 고지혈증의 예방 및 치료에 매우 우수한 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

도면

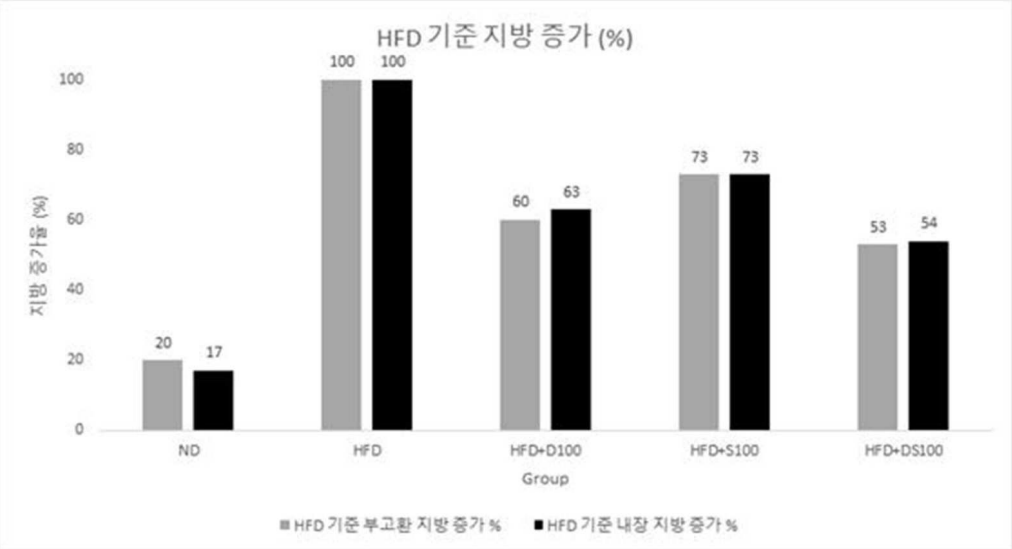
도면1



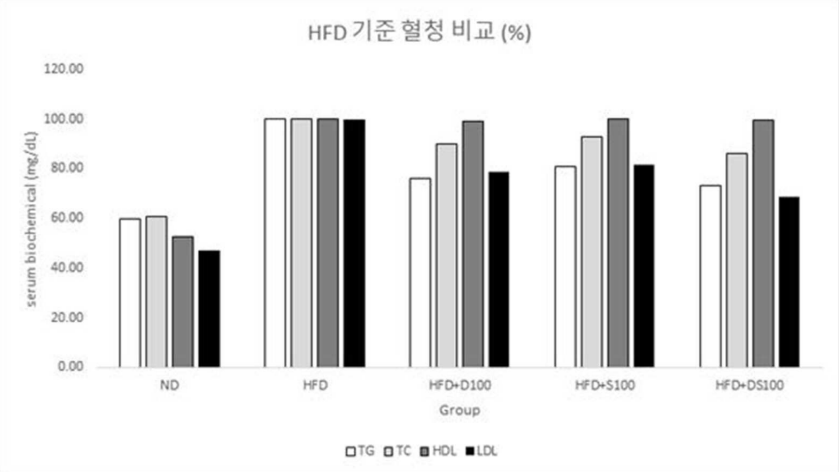
도면2


HFD 기준 체중 증가 (%)
지방 증가율 (%)
100
80
60
40
20
0
34
100
61
71
51
ND
HFD
HFD+D100
HFD+S100
HFD+DS100
Group

도면3


HFD 기준 지방 증가 (%)
지방 증가율 (%)
100
80
60
40
20
0
20
17
100
100
60
63
73
73
53
54
ND
HFD
HFD+D100
HFD+S100
HFD+DS100
Group
HFD 기준 부고환 지방 증가 %
HFD 기준 내장 지방 증가 %

도면4



Serum	Group				
	ND	HFD	HFD+D100	HFD+S100	HFD+DS100
TG (mg/dL)	66.00 ±2.98^{d}	110.42 ±6.80^{a}	84.00 ±3.64^{c}	89.25 ±3.89^{b}	81.08 ±5.02^{c}
TG %	60	100	76	81	73
TC (mg/dL)	125.33 ±4.05^{e}	205.42 ±7.65^{a}	185.00 ±5.97^{c}	190.58 ±7.09^{b}	177.42 ±3.85^{d}
TC %	61	100	90	93	86
HDL-C (mg/dL)	72.58 ±6.16^{b}	137.50 ±8.36^{a}	136.25 ±4.29^{a}	137.58 ±4.19^{a}	137.08 ±5.26^{a}
HDL-C %	53	100	99	100	100
LDL-C (mg/dL)	15.75 ±3.57^{d}	33.50 ±4.36^{a}	26.33 ±3.03^{b}	27.42 ±3.75^{b}	23.00 ±3.77^{c}
LDL-C %	47	100	79	82	69