(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0068887
(43) 공개일자 2013년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/34 (2006.01) *A61K 36/185* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0136325
(22) 출원일자 2011년12월16일
심사청구일자 2011년12월16일

(71) 출원인
한국기초과학지원연구원
대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
장익순
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
최종순
대전광역시 유성구 과학로 169-148
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
백경업

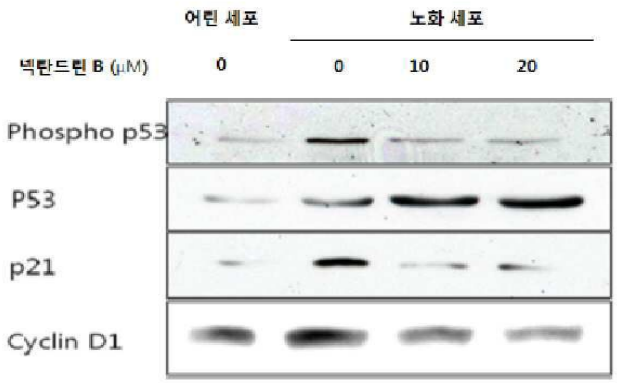
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **육두구 추출물 또는 이로부터 분리된 리그난계 화합물을 함유하는 시르투인 활성화에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 육두구(*Myristica fragrans*) 추출물 또는 이로부터 분리된 리그난계 화합물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물(2,5-bis-aryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran lignan compounds)에 관한 것이다. 상기 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물은 독성물질인 미리스티신 함량이 낮으면서 2,5-비스아릴 테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물의 농도가 높은 것으로 확인되어 기존의 육두구 추출물보다도 독성에 대한 안전성 및 생리활성효과가 높은 것으로 확인된다. 따라서, 상기 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물은 의약품, 화장료 및 식품 등에 유용하게 이용될 수 있으며, 시르투인(sirtuins) 효소를 활성화하는 효과가 있어, 에너지 대사과정에 대한 작용을 통하여 노화, 당뇨병, 신경퇴행성 질환 및 미토콘드리아의 비정상적인 작용과 관련이 있는 각종 질환, 즉, 세포수명의 증가와 관련되는 질환에 대한 예방 또는 치료 효과가 높은 것으로 확인된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

양경은

광주광역시 동구 산수길35번길 25 (계림동)

오원근

광주광역시 북구 두암3동 부영아파트 106동 809호

강건욱

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 242동 2803호 (잠실동, 리센츠)

김자연

전라남도 무안군 몽탄면 우명길 83-27

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

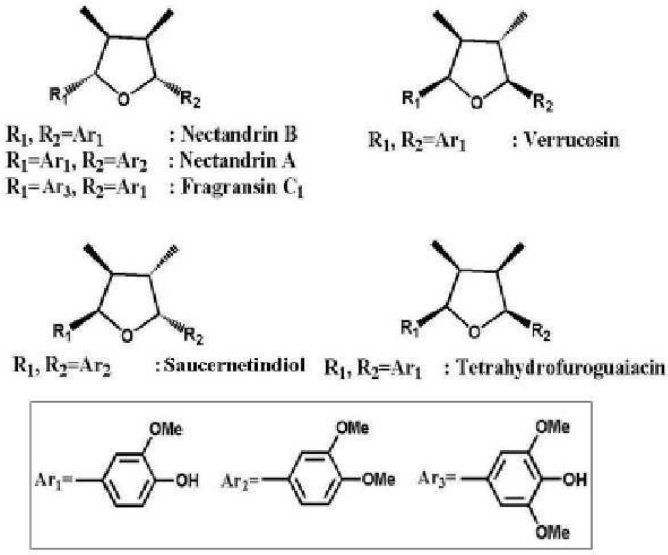
과제고유번호	T31614
부처명	교육과학기술부
연구사업명	NAP 사업
연구과제명	프로테오믹스를 이용한 암 특이적 스모결합단백질의 동정 및 기능 연구
주관기관	기초(연)
연구기간	2011.01.01 ~ 2011.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	A084335
부처명	보건복지가족부
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	대사증후군 제어 관련 약물 표적을 이용한 천연물 유래 료후보물질의 도출
주관기관	서울아산병원
연구기간	2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

미리스티신 함량이 0.5 중량% 이하이고, 하기 화학식 1의 넥탄드린 B(Nectandrin B), 넥탄드린 A(Nectandrin A), 프라그란신 C1(Fragransin C1), 베루코신(Verrucosin), 사우서네틴디올(Saucernetindiol) 및 테트라하이드로푸로구아이아신(Tetrahydrofuroguaiacin)으로 이루어진 화합물 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물이 포함된 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 노화의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]

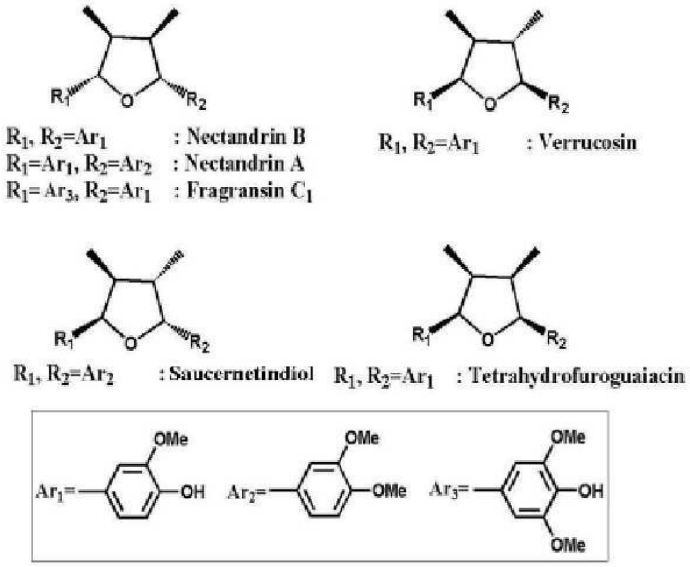


청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물은, 추가로 이온교환수지를 사용하여 독성물질인 미리스티신 함량이 0.1 중량% 이하이고, 하기 화학식 1의 넥탄드린 B(Nectandrin B), 넥탄드린 A(Nectandrin A), 프라그란신 C1(Fragransin C1), 베루코신(Verrucosin), 사우서네틴디올(Saucernetindiol) 및 테트라하이드로푸로구아이아신(Tetrahydrofuroguaiacin)으로 이루어진 화합물 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물이 포함된 것을 특징으로 하는 노화의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

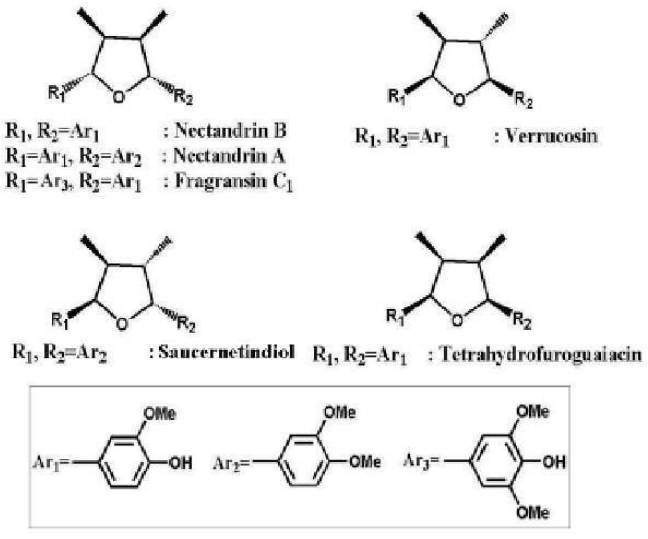
제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 시르투인(sirtuins) 효소의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 노화의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

독성물질인 미리스티신 함량이 0.5 중량% 이하이고, 하기 화학식 1의 넥탄드린 B(Nectandrin B), 넥탄드린 A(Nectandrin A), 프라그란신 C1(Fragransin C1), 베루코신(Verrucosin), 사우서네틴디올(Saucernetindiol) 및 테트라하이드로푸로구아이아신(Tetrahydrofuroguaiacin)으로 이루어진 화합물 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물이 포함된 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 노화의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[화학식 1]



청구항 5

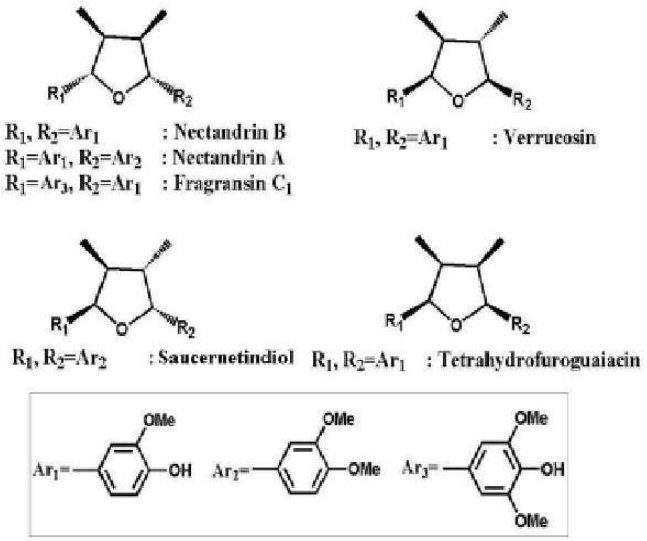
제 4 항에 있어서,

상기 건강기능식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스넥류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료를 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 노화의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

하기 화학식 1의 넥탄드린 B(Nectandrin B), 넥탄드린 A(Nectandrin A), 프라그란신 C1(Fragransin C1), 베루코신(Verrucosin), 사우서네틴디올(Saucernetindiol) 및 테트라하이드로푸로구아이아신(Tetrahydrofuroguaiacin)으로 이루어진 화합물 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 노화의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 약학 조성물은 시르투인(sirtuins) 효소의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 노화의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 육두구(*Myristica fragrans*) 추출물 또는 이로부터 분리된 리그난계 화합물을 함유하는 시르투인(sirtuins) 활성화에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물(2,5-bis-aryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran lignan compounds)을 함유하는 노화의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인구 노령화는 세계적으로 큰 사회적 이슈 중의 하나이다. 미국과 일본의 경우, 65세 이상의 노인 인구는 현재 각각 13%, 16%에 달하며 25년 후에는 24%, 32%에 달할 것으로 예상되고 있다. 일본에서도, 현재 일본의 장수관련 산업의 규모가 39조엔인데, 20년 후에는 155조엔 정도까지 성장할 것이라고 예상하고 있다(2000년 일본 통산성 산업구조조정 심의의원회 "21세기 경제 산업 정책 비전 보고서"). 한국의 경우에도 2010년 기준으로 전체 11.0%인 노인인구가 2030년에는 24.3%에 달할 것으로 예상되기에, 이에 대한 시급한 대책마련이 필요한 상황이다.

[0003] 노화는 유전자, 단백질, 지질 등의 생체 구성성분의 변화를 수반한다. 즉, 노화는 다양한 물리화학적 환경 요인

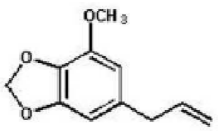
과의 상호 작용에 의해 상기 생체 구성성분의 생화학적 및 생물학적 기능이 변화하는 현상이다. 또한, 노화는 개체의 발생, 세포 분열, 세포 사멸 및 분화 등의 다양한 생명 현상의 변화가 함께 진행되는 복잡하고 종합적인 생명현상이다. 이에 대해, 노화 현상이 세포외 간질 및 세포막 수용체(cell membrane receptor)의 변화를 수반하는 현상이라고 보고되기도 하였다(Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 240(12), 996-1002, 2002).

[0004] 한편, 노화는 비가역적인(irreversible) 반응이기에, 일단 노화가 진행이 되면 이를 어린(young) 상태로 되돌릴 수 없다는 통념이 있었으나, 최근의 연구 결과는, 노화가 일어난 세포를 어린 상태로 되돌릴 수 있음을 시사하고 있다. 이에 대한 예로서, 노화 세포에서 발현이 증가하는 카베올래(caveolae) 구조를 제거하였을 경우, 세포 증식이 회복되고(J. Biol. Chem., 278(30), 27789-27795, 2003), 어린 세포(young cell)를 배양했던 세포간질(extracellular matrix)에서 노화 세포(old cell)를 배양하였을 경우, 세포의 형태가 어린 상태로 전환된다는 것이 보고된 바 있다(J. Biol. Chem., 279(40), 42270-42278, 2004).

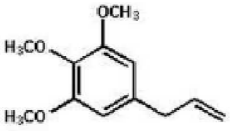
[0005] 노화와 관련된 가장 중요한 기관 중의 하나는 미토콘드리아인데, 노화 관련 거전이 에너지 대사를 조절하는 기전과 관련이 있기 때문이다. 미토콘드리아는 노화를 억제하기 위해 시르투인(sirtuins, SIRTs)이라는 단백질의 발현을 조절하여 NAD^+(nicotinamide adenine dinucleotide$^+$)의 함량을 일정하게 유지하는 역할을 한다. 포유동물 세포에는 7개의 시르투인 단백질들이 있다고 보고되어 있으며(시르투인 1 내지 7), 그 중 시르투인 1은 핵내에 존재하면서 여러 단백질들을 기질로 하여 대사와 아폽토시스(apoptosis), 세포 생존(cell survival) 등의 생명현상을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 특히, 아폽토시스를 조절하는 p53, 세포 생존을 관장하는 FOXO(Forkhead box), 글루코스 항상성(glucose hemeostasis)을 조절하는 PGC-1α(peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha), 전사조절인자인 p300 등에서 아세틸(acetyl)기를 제거하여 이들 단백질의 활성을 조절한다고 보고되어 있다(Physiology[Bethesda], 21, 404-410, 2006). 또한, 시르투인의 활성이 노화와 관련되어 있다는 예로서, 레스베라트롤(resveratrol, 시르투인 단백질을 활성화하는 것으로 알려짐)을 효모(yeast), 초파리, 예쁜꼬마선충(C. elegans) 등에 투여하였을 경우, 수명이 최고 59%까지 연장된 사실이 보고된 바 있다(Nature, 425(6954), 191-196, 2003). 이 외에도, 레스베라트롤을 마우스에 투여한 결과, 레스베라트롤 투여군에서 수명연장 효과가 나타나고, 활동능력이 월등히 증가되는 것으로 관찰된 바 있다. 즉, 레스베라트롤을 섭취한 마우스는 대조군에 비해 근육이 튼튼해지고 2배나 더 먼 거리를 달렸을 정도로 운동능력이 향상된 것으로 확인되었다. 한편, 노화를 억제하는 것보다 더 중요한 것은, 노인성 질환의 감소와 관련된 삶의 질 문제인데(Cell, 127(6), 1109-1122, 2006), 이처럼, 시르투인 활성화 물질들이 근육의 발생을 현저히 증가시키고, 당뇨병·심장병·지방간 등과 관련된 성인병들을 현저히 감소시켜 삶의 질을 향상시킬 수 있다는 것이 보고된 바 있어, 시르투인이 노화 억제 및 건강한 삶과 관련된 중요한 유전자로 부각되고 있다.

[0006] 육두구(*Myristica fragrans*)는 육두구과에 속하는 상록교목으로 수마트라나 자바에서 재배되는 자웅이주 식물이다. 과실은 난구형 육질로서 가운데에 홍색의 가종피에 둘러싸여진 종자를 포함한다. 육두구는 예로부터 소스 등 식품의 향미료로서 광범위하게 이용되어 왔고, 한방에서는 설사, 복부팽만, 구토, 식용감퇴 등의 방향성 건위제로 사용되었다. 그러나, 이러한 육두구의 유용성과 더불어, 많은 문헌에서 육두구를 다량 복용하게 되면 급성독성이 일어난다고 보고하고 있는데, 육두구 추출물에는 인체에 독성을 나타내는 대표적인 물질로서 아래 그림에 개시되어 있는 알킬벤젠 유도체인 미리스티신(myristicin), 엘레미신(elemicin), 샤프롤(safrole) 등이 함께 추출되는 것으로 알려져 있다.

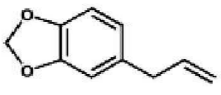
<육두구로부터 발견되는 대표적인 독성물질>



미리스티신(myristicin)



엘레미신(elemicin)



샤프롤(safrole)

[0007]

[0008] 상기 화합물들은 사람이 섭취하면 체내에서 암페타민 유도체로 변화되어 항정신성 약물과 비슷한 독성작용을 나타내는 것으로 잘 알려져 있으며, 전통적으로도 육두구의 독성을 제거하기 위해, 육두구를 석회수에 하루 정도 담가두었다가 불로 건조하여 약재에 사용하기도 했다. 육두구의 독성물질로서 가장 많이 존재하는 것이 미리시트신(Yagaku Zasshi, 128(1), 129-133, 2008)이며, 육두구 메탄올 추출물은 평균 2.1%의 미리스티신을 함유하

고 있는 것으로 보고된 바 있다(Natural Toxins, 5, 186-192, 1997; 생약학회지, 38(1), 19-21, 2007).

[0009] 한편, 본원발명에서는, 상기 육두구로부터 미리스티신 함량이 적고, 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물을 다량 함유하는 육두구 추출물을 추출하여, 상기 추출물 또는 화합물이 시르투인 효소를 활성화함으로써 노화, 당뇨병, 신경퇴행성 질환, 또는 미토콘드리아의 비정상적인 작용과 관련이 있는 각종 질환, 즉, 세포수명의 증가와 관련되는 질환을 예방 또는 치료하는 효과가 있음을 확인한다. 상기, 미토콘드리아의 비정상적인 작용과 관련된 질환으로는, 신경 조직과 근육 조직의 장애 및 대사 질환이 있으며, 이는 노화와도 관련이 있다. 또한, 이 외의 미토콘드리아 관련 질환은 미토콘드리아 활성 저하로 야기되는 신경 정신 질환, 내장 질환, 내분비계 질환, 감각계 질환, 관절 질환 및 근육 질환 중 하나 이상을 포함한다. 이러한 신경 정신 질환은 치매, 파킨슨병, 뇌졸중, 신경정신장애, 자폐증, 정신 지체, 발작(seizure), 뇌졸중 유사 발작, 편두통 및 신경 통증 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 내장 질환은 간부전, 장 간폐색증(intestinal pseudo-obstruction), 과민성 장 증후군, 위식도역류질환, 변비, 설사, 신세뇨관성산증(renal tubular acidosis) 및 판코니 증후군(fanconi syndrome)중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 내분비계 질환은 췌장 외 분비 기능부족증, 갑상선 기능 저하증(hypothyroidism), 부갑상선 기능 저하증(hypoparathyroidism), 생식 기능 저하증(hypogonadism), 발달 지연, 제2형 당뇨 및 저혈당 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 감각계 질환은 시신경위축, 사시, 망막색소변성증, 실명 및 청력 손실 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 관절 질환은 퇴행성 관절염, 류마티스성 관절염 및 골성관절염 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 근육 질환은 운동실조(ataxia), 구음장애(dysarthria), 연하곤란(dysphagia), 경직(spasticity), 뇌근병증, 근육통, 근이영양증, 근육 경련, 안검하수, 눈근육마비, 진행성 외안근 마비, 레버 시신경 위축증(Leber's hereditary optic neuropathy), 호흡장애, 반사 작용 저하 및 자율신경실조증 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0010] 한편, 육두구 추출물과 관련된 선행 특허로는 "생약 추출물을 포함하는 콜레스테롤 에스터레이즈 저해용 조성물(한국등록특허 제399529호)", "한약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 또는 치료용 약학 조성물(한국등록특허 제795976호)" 및 "한약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 관상동맥성 심장 질환 또는 동맥경화증의 예방 또는 치료용 약학 조성물(한국등록특허 제793204호)" 등이 있으나 이들은 단지 활성성분이 규명되지 않은 육두구 추출물 자체를 사용한 것으로 육두구 추출물 중에 함유된 화합물의 활성을 확인한 본 발명과는 관련성이 적다.

[0011] 육두구 추출물에서 분리된 화합물과 관련된 선행 특허로는 "항암제로 유발되는 독성의 억제제 및 이를 함유하는 항암제 조성물(한국등록특허 제646574호)", "리그난계 화합물을 유효성분으로 함유하는 여드름 치료 또는 예방용 조성물(한국등록특허 제567431호)", "간보호 및 간장질환 치료용 의약 조성물(한국등록특허 제619498호)", "리그난계 화합물을 함유하는 염증성 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물(한국등록특허 제579752호)", "제2형 당뇨병 치료 또는 예방용 약제학적 조성물(한국등록특허 제627643호)", "메이스리그난 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 ＰＰＡＲα에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물(한국등록특허 제830192호)", "리그난계 화합물을 함유하는 뇌신경질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물(한국등록특허 제679306호)" 등이 있으나, 이들은 메이스리그난(macelignan) 화합물을 이용한 다양한 활성이 개시된 것으로서, 상기 메이스리그난 화합물은 본 발명의 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물과는 그 구조와 특성이 다르다.

[0012] 또한, 시르투인 활성과 관련된 선행 특허로는 "산뽕나무 추출물을 포함하는 조성물(한국등록특허 제826209호)", "티아졸로피리딘 시르투인 조절 화합물(한국공개특허 제2011-0110194호)", "시르투인 조절제로서의 프탈라지논 및 관련 유사체(한국공개특허 제2011-0102468호)", "시르투인 조절제로서의 이소인돌리논 및 관련 유사체(한국공개특허 제2011-0098789호)", "시르투인 조절제로서의 피리딘, 비시클릭 피리딘 및 관련 유사체(한국공개특허 제2011-0079763호)", "시르투인 조절제로서의 퀴나졸리논, 퀴놀론 및 관련 유사체(한국공개특허 제2011-0065536호)", "시르투인 조절제로서의 크로메논 유사체(한국공개특허 제2011-0063573호)", "시르투인 조절제로서의 벤족사졸, 벤즈티아졸 및 관련 유사체(한국공개특허 제2011-0044291호)" 등이 있으나, 상기 특허에 개시된 화합물은 본 발명의 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물과는 그 구조와 특성이 다르다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 육두구(*Myristica fragrans*) 추출물 또는 이로부터 분리된 리그난계 화합물을 함유하는 시르

투인(sirtuins) 활성화에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다. 본 발명의 또 다른 목적은, 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물(2,5-bis-aryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran lignan compounds)을 유효성분으로 함유하는 노화의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

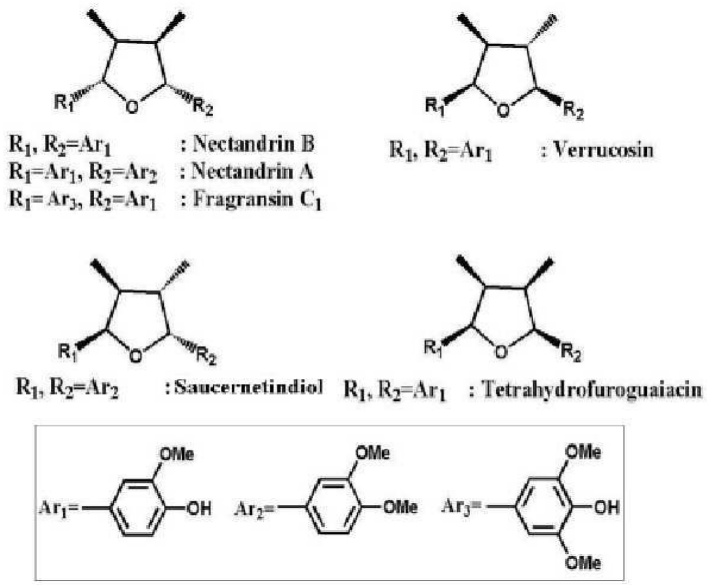
과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 육두구(*Myristica fragrans*) 추출물 또는 이로부터 분리된 리그난계 화합물을 함유하는 시르투인(sirtuins) 활성화에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0015] 상기 육두구 추출물 또는 이로부터 분리된 리그난계 화합물은 시르투인 활성화에 작용하므로 세포수명의 증가와 관련되는 질환, 즉 노화, 당뇨병, 신경퇴행성 질환 및 미토콘드리아의 비정상적인 작용과 관련이 있는 각종 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있으며, 바람직하게는 노화의 예방 또는 치료용 조성물로 사용할 수 있다. 또한 상기 육두구 추출물은 육두구를 10~30% 에탄올 수용액 추출물로 추출하여 미리스티신 등의 독성물질이 제거된 상태로 제조되어 안정성이 높다.

[0016] 따라서, 바람직하게는, 본 발명은 미리스티신 함량이 0.5 중량% 이하이고, 하기 화학식 1의 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물(2,5-bis-aryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran lignan compounds)인, 넥탄드린 B(Nectandrin B), 넥탄드린 A(Nectandrin A), 프라그란신 C1(Fragransin C1), 베루코신(Verrucosin), 사우서네틴디올(Saucernetindiol) 및 테트라하이드로푸로구아이아신(Tetrahydrofuroguaiacin)으로 이루어진 화합물 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물이 포함된 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 노화의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 또한, 본 발명은 상기 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물로부터 분리된 상기 화학식 1의 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물(2,5-bis-aryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran lignan compounds)인, 넥탄드린 B(Nectandrin B), 넥탄드린 A(Nectandrin A), 프라그란신 C1(Fragransin C1), 베루코신(Verrucosin), 사우서네틴디올(Saucernetindiol) 및 테트라하이드로푸로구아이아신(Tetrahydrofuroguaiacin)으로 이루어진 화합물 중 1종 이상을 함유하는 것을 특징으로 하는 노화의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0020] 상기 2,5-비스아릴 테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물은 육두구를 마쇄한 후 에탄올 10~30% 수용액으로 추출하는 단계; 및, 크로마토그래피를 이용하여 시르투인 활성화 효과가 있는 2,5-비스아릴 테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물을 순수하게 분리 정제하는 단계;를 통해 얻을 수 있다.

[0021] 상기 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물은 추가로 이온교환수지를 사용하여 남아있는 미량의 미리스티신을 제거함과 동시에 2,5-비스아릴 테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물을 농축시킬 수 있다. 따라서, 상기 이온교환

수지 용출물은 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물처럼 상기 화학식 1의 2,5-비스아릴 테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물인, 넥탄드린 B(Nectandrin B), 넥탄드린 A(Nectandrin A), 프라그란신 C1(Fragransin C1), 베루코신(Verrucosin), 사우서네틴디올(Saucernetindiol) 및 테트라하이드로푸로구아이다신(Tetrahydrofuroguaiacin)로 이루어진 화합물 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 육두구의 이온교환수지 용출물의 미리스티신 함량은 0.1 중량% 이하일 수 있다. 상기 이온교환수지는 더욱 상세하게는 합성흡착제로서 방향족계 무치환 수지(디아이온 HP-20류, SP825류, AXT204류, XAD1600T류, MN200류) 중의 하나일 수 있다.

[0022] 본 발명의 2,5-비스아릴 테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물인 넥탄드린 B(Nectandrin B), 넥탄드린 A(Nectandrin A), 프라그란신 C1(Fragransin C1), 베루코신(Verrucosin), 사우서네틴디올(Saucernetindiol) 및 테트라하이드로푸로구아이다신(Tetrahydrofuroguaiacin)은 육두구로부터 유기용매(알코올, 에테르, 아세톤 등)에 의한 추출, 헥산과 물의 분배, 칼럼크로마토그래피에 의한 방법 등, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합하여 용이하게 얻을 수가 있다. 조추출물은 필요에 따라서 상법에 따라서 더욱 정제할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 사용하는 크로마토그래피에는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 칼럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 박층크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등이 이용될 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물은 육두구로부터 쉽게 분리할 수 있을 뿐만 아니라 안정도도 높으므로 식품, 의약품의 첨가제로 이용할 수 있다.

[0025] 상기 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 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 본 발명의 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물을 함유하는 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물을 함유하는 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는

뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 추출물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0028] 또한, 본 발명은 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다. 상세하게는, 본 발명은 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 시르투인 활성화에 의해 매개되는 질환, 즉, 노화, 당뇨병, 신경퇴행성 질환 및 미토콘드리아의 비정상적인 작용과 관련이 있는 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물은 독성물질인 미리스티신 함량이 낮으면서 2,5-비스아릴테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물의 농도가 높아 기존의 육두구 추출물보다도 독성에 대한 안전성 및 생리활성효과가 높은 것으로 확인된다. 또한, 상기 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물은 시르투인(sirtuins) 효소를 활성화하는 효과가 있어, 에너지 대사과정에 대한 작용을 통하여 노화, 당뇨병, 신경퇴행성 질환 및 미토콘드리아의 비정상적인 작용과 관련이 있는 각종 질환, 즉, 세포수명의 증가와 관련되는 질환에 대한 예방 또는 치료를 위한 의약품, 화장품 및 식품 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 육두구를 30% 에탄올로 추출한 추출물에서 분리한 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물을 HPLC로 분석한 스펙트럼 결과를 나타내는 그림이다.

도 2는 넥탄드린 B(10~20㎛M)를 노화 세포에 처리한 후, 넥탄드린 B 처리군에서 p53의 인산화 및 p21의 발현이 어린 세포 수준으로 감소하는 것을 웨스턴 블롯을 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그림이다.

도 3은 넥탄드린 B(50㎍/day)를 초파리에 투여하여, 상기 넥탄드린 B를 처리한 초파리의 개체 생존률이 대조군보다 높았음을 보여주는 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 96주령(24개월)의 자연적으로 노화된 C57BL/6J 수컷 마우스에 넥탄드린 B(20mg/kg/day)를 투여하여, 상기 넥탄드린 B를 섭취한 마우스의 근육에서 시르투인 단백질의 활성이 증가하였음을 웨스턴 블롯을 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 또한 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 제공되는 것이다.

[0032] **<실시예 1 : 미리스티신 함량이 적은 육두구 에탄올 수용액 추출물의 제조>**

[0033] 분쇄된 육두구 100g을 각 용매(표1 참조) 500㎖에 넣어 2시간 동안 3회에 걸쳐 초음파 추출기를 사용하여 각 용매조건에 대한 추출물을 제조하였다. 분리된 추출물은 동일 농도로 제조하여 사용하였고, 미리스티신 표준품은 시그마사(제품번호: M9237)에서 구입하였다. 각각의 육두구 용매 추출물과 미리스티신 표준품은 MeOH-H_2O(0-32min : 63% MeOH, 32-37min : 63→100% MeOH) 조건의 HPLC[Optima Pak C_{18} column 4.6×250mm, 5㎛m 입자 크기, 유속 1㎖/min, UV detection: 260nm]를 이용하여 분석하였고, 각각의 육두구 추출물의 미리스티신 함량은 표 1에 나타내었다.

표 1

[0034]

알코올 추출용매	추출물 중 미리스티신의 함량(%)	추출물 중 넥탄드린 B의 함량(%)
물 추출액	0.19%	0.62
10% 에탄올 수용액 추출물	0.31%	0.94
20% 에탄올 수용액 추출물	0.33%	2.98

30% 에탄올 수용액 추출물	0.45%	7.48
40% 에탄올 수용액 추출물	1.34%	1.95
50% 에탄올 수용액 추출물	1.48%	2.77
75% 에탄올 수용액 추출물	1.27%	2.95
75% 메탄올 수용액 추출물	1.85%	7.47

[0035] 표 1에 나타난 바와 같이, 30% 에탄올 수용액 추출물의 미리스티신 함량이, 다른 조건의 추출물에서보다 평균 3배 정도 적게 추출되는 것으로 확인되었다. 또한, 각 조건의 육두구 용매 추출물을 MeOH-H_2O(0-35min: 60% MeOH, 35-60min : 60→100% MeOH) 조건의 HPLC[OptimaPak_C_{18} column 4.6x250mm, 5㎛ 입자 크기, 유속 1㎖/min, UV detection : 205, 280nm]를 이용하여 넥탄드린 B의 함량을 분석한 결과(표 1 참조), 30% 에탄올 수용액 추출물에서 넥탄드린 B가 가장 많이 추출됨을 알 수 있었다. 따라서, 활성물질의 양을 최대로 하면서 독성물질의 함량을 최소로 하는 조건은, 30% 이하 에탄올 수용액으로 육두구를 추출하는 것임을 확인할 수 있었다.

[0036] **<실시예 2 : 육두구 에탄올 수용액 추출물로부터 독성물질 미리스티신의 추가 제거>**

[0037] 육두구 100g을 30% 에탄올 수용액 500㎖로 추출한 후 이온교환수지 중의 하나인 디아이온 HP-20 500g에 통과시켜 흡착시켰다. 이후 30 내지 90% 에탄올 수용액, 100% 에탄올 및 100% 아세톤을 각각 500㎖씩 사용하여 상기 흡착물을 용출하였으며 상기 용출물에 포함된 미리스티신 및 넥탄드린 B의 함량을 표 2에 나타내었다. 표 2를 참고하면, 상기 흡착물을 80% 이하 에탄올 수용액을 사용하여 용출할 때, 미리스티신이 거의 검출되지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 넥탄드린 B는 80% 에탄올 수용액을 용매로 이용했을 때가 많이 용출되는 것으로 확인되었다.

표 2

[0038]

용출 용매조건	30% 에탄올 수용액	50% 에탄올 수용액	70% 에탄올 수용액	80% 에탄올 수용액	90% 에탄올 수용액	100% 에탄올	아세톤
용출물 중의 넥탄드린 B의 함량	0.01%	0.1%	24.2%	61.0%	13.9%	1.0%	3.0%
용출물 중의 미리스티신의 함량	0.04%	0.04%	0.04%	0.04%	0.66%	20.77%	13.71%

[0039] **<실시예 3 : 육두구로부터 추출된 화합물의 확인>**

[0040] 상기 실시예 1의 30% 에탄올 수용액 육두구 추출물에서 HPLC를 이용하여 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물을 분리하였으며, 상기 화합물에 대해 HPLC(도 1 참조), ^{1}H, ^{13}C-NMR을 이용하여 그 특성을 분석하였다. 상기 화합물의 물리화학적 특성은 다음과 같다.

[0041] **3-1. 테트라하이드로푸로구아이아신 (Tetrahydrofuroguaiacin, 화합물 1)**

[0042] 무색의 분말, 수소핵자기공명스펙트럼: ppm(500 MHz, $CDCl_3$): δ 0.61(6H, d, *J*=6.0 Hz, 3- and 4-Me), 2.67(2H, m, 3- and 4-H), 3.91(6H, 3'- and 3"-OMe), 5.12(2H, d, *J*=6.6 Hz, 2- and 5-H), 5.59(2H, s, 4'- and 4"-OH), 6.90-6.99(6H, m, 2'-, 5'-, 6'-, 2"-, 5"- and 6"-H), 탄소핵자기공명스펙트럼 : ppm (125 MHz, $CDCl_3$): δ 11.7(3- and 4-Me), 41.5(C-3 and C-4), 55.8(2×OMe), 82.7(C-2 and C-5), 109.0(C-2' and C-2"), 113.9(C-5' and C-5"), 119.3(C-6' and C-6"), 132.5(C-1' and C-1"), 144.3(C-4'and C-4"), 146.2(C-3' and C-3").

[0043] **3-2. 사우서네틴디올 (Saucernetindiol, 화합물 2)**

[0044] 무색의 오일, 수소핵자기공명스펙트럼: ppm(500 MHz, $CDCl_3$): δ 0.63(3H, d, *J*=6.5 Hz, 4-Me), 1.01(3H, d, *J*=6.5 Hz, 3-Me), 2.33(2H, m, 3- and 4-H), 3.90-3.92(6H, 3'- and 3"-OMe), 4.65(1H, d, *J*=9.5 Hz, 2-H), 5.46(1H, d, *J*=4.5 Hz, 5-H), 5.58(2H, s, 4'- and 4"-OH), 6.77-6.99(6H, m, 2'-, 5'-, 6'-, 2"-, 5"- and 6"-H), 탄소핵자기공명스펙트럼 : ppm (125 MHz, $CDCl_3$): δ 9.42(3-Me), 11.83(4-Me), 43.4(C-3), 47.6(C-4), 55.8(2×OMe), 84.8(C-2), 85.7(C-5), 108.3(C-2'), 108.7(C-2"), 113.9(C-5'), 114.0(C-5"), 118.8(C-6'),

119.3(C-6"), 132.6(C-1'), 135.0(C-1"), 144.3(C-4'), 145.0(C-4"), 146.3(C-3"), 146.6(C-3').

[0045] **3-3. 베루코신 (Verrucosin, 화합물 3)**

[0046] 무색의 오일, 수소핵자기공명스펙트럼: ppm(500 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.67(3H, d, *J*=6.5 Hz, 4-Me), 1.06(3H, d, *J*=6.5 Hz, 3-Me), 1.79(1H, m, 3-H), 2.25(1H, m, 4-H), 3.87-3.89(6H, 3'- and 3"-OMe), 4.36(1H, d, *J*=9.5 Hz, 2-H), 5.10(1H, d, *J*=9.0 Hz, 5-H), 6.80-6.96(6H, m, 2'-, 5'-, 6'-, 2"-, 5"- and 6"-H), 탄소핵자기공명스펙트럼: ppm(125 MHz, $CDCl_3$) : δ 14.8(3-Me), 15.2(4-Me), 45.9(C-4), 46.8(C-3), 56.4(2×OMe), 84.6(C-2), 89.0(C-5), 111.6(C-2'), 111.9(C-2"), 115.7(C-5'), 116.1(C-5"), 120.7(C-6'), 120.9(C-6"), 133.0(C-1'), 133.8(C-1"), 147.5(C-4'), 146.8(C-4"), 148.6(C-3"), 149.0(C-3').

[0047] **3-4. 넥탄드린 B (Nectandrin B, 화합물 4)**

[0048] 무색의 오일, 수소핵자기공명스펙트럼: ppm(600 MHz, $CDCl_3$): δ 1.05(6H, d, *J*=6.0 Hz, 3- and 4-Me), 2.35(2H, m, 3- and 4-H), 3.85(6H, 3'- and 3"-OMe), 4.53(2H, d, *J*=5.4 Hz, 2- and 5-H), 5.74(2H, brs, 4'- and 4"-OH), 6.91(2H, d, *J*=7.8 Hz, 5'- and 5"-H), 6.93(2H, dd, *J*=1.8, 7.8 Hz, 6'- and 6"-H), 6.99(2H, d, *J*=1.8 Hz, 2'- and 2"-H), 탄소핵자기공명스펙트럼: ppm(200 MHz, $CDCl_3$): δ 133.9(C-1' and C-1"), 114,1(C-2' and C-2"), 146.4(C-3' and C-3"), 144.9(C-4' and C-4"), 109.2(C-5' and C-5"), 119.1(C-6' and C-6"), 87.2(C-2 and C-5), 44.1(C-3 and C-4), 12.7(3-Me and 4-Me), 55.7(-OMe × 2).

[0049] **3-5. 넥탄드린 A (Nectandrin A, 화합물 5)**

[0050] 흰색결정, 수소핵자기공명스펙트럼: ppm(500 MHz, $CDCL_3$) δ: 1.00(3H, d, *J*=3.5 Hz, 4-Me), 1.02(3H, d, *J*=3.5 Hz, 3-Me), 2.27(2H, m, 3- and 4-H), 3.80 - 3.86(9H, s, 3×OMe), 4.43(1H, d, *J*=7.5 Hz, 2-H), 4.44(1H, d, *J*=7.5 Hz, 5-H), 6.81-7.09(6H, m, Ar-H); 탄소핵자기공명스펙트럼: ppm(125 MHz, $CDCL_3$) δ: 13.1(3-Me), 13.2(4-Me), 45.6(C-4), 45.5(C-3), 56.1-56.3(3×OMe), 88.0(C-5), 88.2(C-2), 110.9(C-2'), 111.3(C-2"), 112.7(C-5'), 115.5(C-5"), 119.5(C-6'), 120.0(C-6"), 135.1(C-1'), 136.4(C-1"), 146.9(C-4'), 148.3(C-4"), 149.9(C-3"), 150.4(C-3').

[0051] **3-6. 프라그란신 C1 (Fragransin C1, 화합물 6)**

[0052] 무색의 오일, 수소핵자기공명스펙트럼: ppm(500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.04(3H, d, *J*=6.6 Hz, 3-Me), 1.06(3H, d, *J*=7.2 Hz, 4-H), 2.32(1H, m, 3-H), 2.34(1H, m, 4-H), 3.88(9H, 3'-, 5'- and 3"-OMe), 4.50(1H, d, *J*=7.2 Hz, 2-H), 4.52(1H, d, *J*=7.2 Hz, 5-H), 5.47-5.58(2H, br, s, 4'- and 4"-OH), 6.67(2H, br, s, 2'- and 6'-H), 6.91-6.97(3H, m, 2"-, 5"- and 6"-H), 탄소핵자기공명스펙트럼: ppm(125 MHz, $CDCl_3$): δ 12.9(3-Me), 13.1(4-Me), 44.0(C-3), 44.5(C-4), 56.3-55.8(3×OMe), 87.2(C-2), 87.5(C-5), 103.1(C-2' and C-6'), 102.9(C-2"), 114.1(C-5"), 119.3(C-6"), 134.0(C-1'), 133.5(C-1"), 145.1(C-4'), 146.4(C-4"), 146.9(C-3', C-5' and C-3").

[0053] **<실시예 4 : 어린 세포와 노화 세포의 준비>**

[0054] 본 발명에 이용된 어린 세포와 노화 세포는 인간 섬유아세포(primary cells 상태)를 이용하여 제조하였다. 상기 세포들은 신생아의 음경포피(foreskin)에서 분리하였으며, 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium)에서 트립신-EDTA(trypsin-EDTA)를 이용한 계대배양을 통해 세포를 배양하였다. 이 중, 어린 세포로는 계대배양을 10번 이내로 수행한 세포를 이용하였고, 노화 세포로는 계대배양을 30회 이상 수행한 세포를 이용하였다.

[0055] **<실시예 5 : 시르투인 효소의 활성 확인>**

[0056] 본 발명의 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 또는 이로부터 분리된 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난계 화합물이 시르투인 효소의 활성에 어떠한 영향을 주는지를 확인하기 위해 시르투인 1 내지 3의 발현량을 확인하였다.

[0057] 이를 위해, 어린 세포(계대배양 8번 수행)와 노화 세포(계대배양 35번 수행)를 세포배양접시(60mm)에서 상기 배양접시 바닥의 60~70%가 채워지도록 배양한 다음(1~2일), 0.1% BSA(bovine serum albumin) 또는 혈청결핍(serum-starvation) 배지 상에서 상기 세포를 2일간 키워, 세포상태가 G1 억제(G1 arrest) 상태에 이르게 하였

다. 이 후, 상기 세포에 실시예 1의 육두구의 30% 에탄올 수용액 추출물(20~40㎍/㎖), 실시예 2의 80% 에탄올 용출물(20~40㎍/㎖), 본 발명의 화합물 **1** 내지 **6**(10~20μM)을 처리하였다. 상기 화합물 1 내지 6은 디메틸설폭사이드(DMSO)에 녹여 1M 스탁용액(stock solution)을 만들고 이를 세포배양배지에 희석하여 사용하였다.

[0058] 단백질의 발현량을 확인하기 위해서는 웨스턴 블롯을 수행하였으며, 각각의 세포에 SDS 샘플 버퍼를 처리하여 수거한 뒤, 초음파를 이용하여 세포를 파쇄하여 단백질 용출액을 얻었다. 이 후, 상기 단백질 용출액을 이용하여 10% SDS-PAGE 전기영동을 실시하고 습식(wet) 트랜스퍼 키트를 이용하여 나이트로셀룰로오스 트랜스퍼 멤브레인에 단백질을 고착시켰다. 상기 멤브레인은 5% 스킴밀크(skim milk)에서 1시간 동안 상온 조건으로 블로킹(blocking)하고, 각 단백질에 대한 1차 항체 및 이에 대한 2차 항체를 반응시킨 후, 각각의 단백질의 발현량 변화를 확인하였으며, 이에 대한 결과를 표 3에 나타내었다. 각 결과값은 노화 세포의 대조군을 기준(1.00)으로 하여 이에 대한 폴드(fold)값으로 표시하였다.

표 3

[0059]

노화 세포(계대배양 35번 수행)		단백질 발현량 (fold)		
		시르투인 1	시르투인 2	시르투인 3
대조군	농도	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1
화합물 1(테트라하이드로푸로구아이아신) 처리군	10μM	2.5±0.2	1.5±0.2	2.5±0.1
	20μM	4.3±0.2	2.8±0.1	4.7±0.1
화합물 2(사우서네틴디올) 처리군	10μM	3.8±0.3	1.3±0.1	3.8±0.2
	20μM	5.4±0.1	2.5±0.2	5.8±0.1
화합물 3(베루코신) 처리군	10μM	2.9±0.2	1.2±0.2	3.9±0.2
	20μM	4.6±0.1	2.3±0.3	5.6±0.2
화합물 4(넥탄드린 B) 처리군	10μM	4.4±0.2	1.4±0.1	5.3±0.1
	20μM	8.3±0.2	2.3±0.1	6.0±0.2
화합물 5(넥탄드린 A) 처리군	10μM	4.3±0.3	1.3±0.1	4.3±0.2
	20μM	6.2±0.2	2.6±0.2	6.3±0.1
화합물 6(프라그란신 C1) 처리군	10μM	4.3±0.1	1.2±0.1	4.8±0.2
	20μM	6.5±0.1	2.4±0.2	6.6±0.2
실시예 1의 육두구의 30% 에탄올 수용액 추출물	20㎍/㎖	2.6±0.2	1.2±0.2	2.5±0.1
	40㎍/㎖	4.4±0.2	2.5±0.1	4.4±0.1
실시예 2의 80% 에탄올 수용액 용출물	20㎍/㎖	3.4±0.2	1.2±0.1	3.4±0.1
	40㎍/㎖	5.6±0.1	2.2±0.2	5.4±0.1
* 어린 세포(계대배양 8번 수행)는 노화세포(계대배양 35번 수행)의 대조군(fold값 1.00)에 비해 시르투인 1 및 3의 단백질 발현량이 6~7배 많으며, 시르투인 2의 단백질 발현량은 2~3배 많음				

[0060] 표 3의 결과를 참고하면, 실시예 1의 육두구의 30% 에탄올 수용액 추출물, 실시예 2의 80% 에탄올 용출물, 본 발명의 화합물 1 내지 6을 처리한 노화 세포에서의 시르투인 1 내지 3 단백질의 발현량이 대조군보다 현저하게 증가되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 추출물 및 화합물들은 농도 의존적으로 노화 세포의 시르투인 1 내지 3 단백질의 발현량을 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0061] **<실시예 6 : 노화 마커의 발현 확인>**

[0062] 본 발명의 화합물이 노화 세포에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해, 노화 세포(계대배양 35번 수행)에 넥탄드린 B(10~20μM)를 처리한 후, 노화 세포에서 증가되는 것으로 확인되는 p53의 인산화 및 p21의 발현량을 웨스턴 블롯을 이용해 확인하였다. 상기 웨스턴 블롯은 실시예 5와 동일한 방법으로 수행하였고, 이에 대한 결과는 도 2에 나타내었다.

[0063] 도 2의 결과를 참고하면, 노화 세포에서 어린 세포(계대배양 8번 수행)에 비해 증가되어 있던 p21의 발현 및 p53의 인산화가 넥탄드린 B의 처리 후 어린 세포 수준으로 감소된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 넥탄드린 B의 처리로 인해 세포주기가 활성화되면서 노화 세포에서도 세포 증식이 일어나고 있음을 확인할 수 있었다.

[0064] **<실시예 7 : 초파리에서 수명연장 효과 검증>**

[0065] [1단계] 초파리 준비 및 사육

[0066] 야생형 Canton-S 초파리는 블루밍턴 스탁 센터[Bloomington Drosophila Stock Center(BDSC) Indiana, USA]에서 얻어서 사용하였다.

[0067] [2단계] 초파리 수명연장 효과 측정

[0068] 초파리의 수명 연장 효과는, 성체 이후 전체 초파리의 개체가 50% 감소하였을 때 남아있는 개체수를 측정(median life span)하여 결정하는데, 이 때, 대조군으로는 사료에 동일량의 PEG(polyethylen glycol)를 첨가한 시료를 사용하였으며, 실험군으로는 넥탄드린 B(50㎍/day)를 PEG에 용해시켜 먹이에 넣고 초파리를 배양한 후 이들의 생존율을 도 3에 나타내었다.

[0069] 도 3을 참고하면, 넥탄드린 B(50㎍/day)를 처리한 군에서 초파리의 개체 생존률이 증가되는 것을 알 수 있었으며, 상기 결과로 인해 상기 넥탄드린 B를 처리한 초파리 개체들에서 노화가 억제되고 있음을 확인할 수 있었다.

[0070] **<실시예 8 : 자연노화동물을 이용하여 항노화 효과 검정>**

[0071] [1단계] 시료준비

[0072] 항노화 실험을 위해, 넥탄드린 B(20mg/kg/day)를 C57BL/6J 수컷 마우스에 이틀에 한번 경구투여하였다. 넥탄드린 B는 폴리에틸렌글라이콜-400(Sigma Co., USA) 30% 수용액에 녹여서 준비하였다.

[0073] [2단계] 실험군 설정 및 노화동물에서의 효과 검증

[0074] 노화 동물로는 96주령(24개월)의 자연적으로 노화된 C57BL/6J 수컷 마우스를 군당 10마리씩 준비하여 사용하였으며, 대조군의 어린 동물로는 6주령의 C57BL/6J 수컷 마우스를 준비하였다. 상기 마우스는 1주간의 적응기간을 가진 후, 개별 우리에 분리하여 12시간 간격의 낮(오전 7시~오후17시)과 밤의 주기에 따라 관리하였다.

[0075] 항노화 효과 검정용 실험군은 ① 6주령 마우스 정상식이군 ① 96주령 마우스 정상식이군, ② 96주령 마우스 넥탄드린 B(10mg/kg/day) 처리군, ③ 96주령 마우스 넥탄드린 B(20mg/kg/day) 처리군으로 설정하였다. 상기 넥탄그린 B 처리군은 정상식이와 더불어 넥탄드린 B(10~20mg/kg/day)를 2일 1회씩 12주 동안 일정한 시간(오전 10시)에 경구투여하였다. 4주간 처리 후 각각의 마우스를 희생하여, 근육에서 시르투인 1 내지 3의 단백질 발현량을 확인하였으며 이에 대한 결과는 도 4에 나타내었다. 정상식이군에는 넥탄드린 B 대신 폴리에틸렌글라이콜-400(Sigma Co., USA) 30% 수용액을 투여하였다.

[0076] 도 4의 결과를 참고하면, 96주령 마우스 정상식이군(노화 동물)에서는 시르투인 1 내지 3의 발현이, 6주령 마우스 정상식이군(어린 동물)보다 현저하게 줄어들어 있는 반면, 넥탄드린 B를 투여한 96주령 마우스(넥탄드린 B 투여 노화 동물)의 근육에서는 시르투인 1 내지 3의 발현이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 특히, 넥탄드린 B 20mg/kg/day의 투여 농도에서는 시르투인 2 및 3의 발현이 6주령 마우스(어린 동물)의 근육에서와 유사한 양상으로 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] **<실험예 9 : 독성실험>**

[0078] **9-1. 급성독성**

[0079] 본 발명의 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 및 넥탄드린 B를 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 30마리를 대조군과 실험군에 각각 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v) 만을 투여하고, 실험군은 육두구 10~30% 에탄올 추출물 및 넥탄드린 B를 상기 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v)에 녹여 실시예 8에서 이용된 투여농도인 20mg/kg/day의 100배(2g/kg/day)의 농도로 각각 경구투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 2g/kg/day 농도의 육두구 추출물 및 넥탄드린 B를 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.

[0080] **9-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험**

[0081] 장기 독성 실험은 본 발명의 본 발명의 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 및 넥탄드린 B를 각 농도로 8주 동안 노화 모델로 이용된 C57BL/6J 마우스(각 군당 10마리)에 투여하여 실험하였다. 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 발명의 육두구 10~30% 에탄올 수용액 추출물 및 넥탄드린 B를 투여한 실험군과 PEG-400/tween-80/EtOH(8/1/1, v/v/v)만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 정취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰

을 시행하였으며 모든 조직에서 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0082] **<제제예 1 : 약학적 제제>**

[0083] **1-1. 정제의 제조**

[0084] 넥탄드린 B 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0085] **1-2. 주사액제의 제조**

[0086] 넥탄드린 B 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0087] **<제제예 2 : 식품 제조>**

[0088] **2-1. 조리용 양념의 제조**

[0089] 본 발명의 육두구 30% 에탄올 수용액 추출물을 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0090] **2-2. 밀가루 식품의 제조**

[0091] 본 발명의 육두구 30% 에탄올 수용액 추출물을 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0092] **2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0093] 본 발명의 육두구 30% 에탄올 수용액 추출물을 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0094] **2-4. 유제품(dairy products)의 제조**

[0095] 본 발명의 육두구 30% 에탄올 수용액 추출물을 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0096] **2-5. 야채주스 제조**

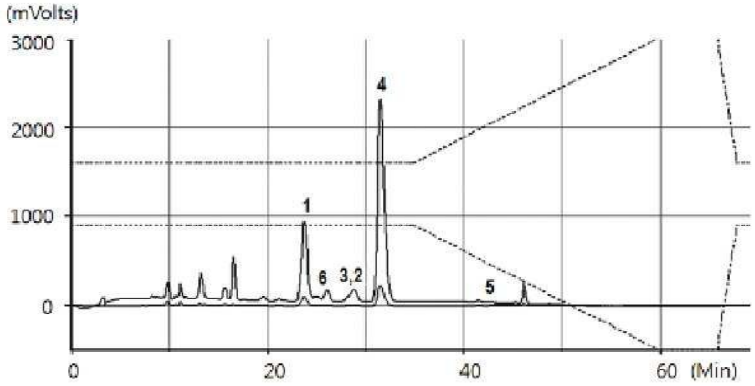
[0097] 본 발명의 육두구 30% 에탄올 수용액 추출물 0.5g을 토마토 주스 또는 당근주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0098] **2-6. 과일주스 제조**

[0099] 본 발명의 육두구 30% 에탄올 수용액 추출물 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

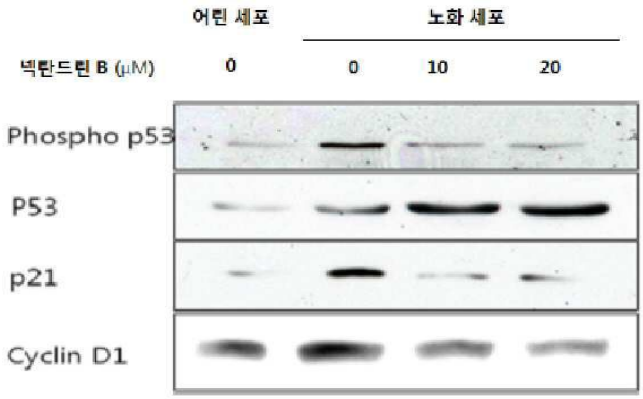
도면

도면1

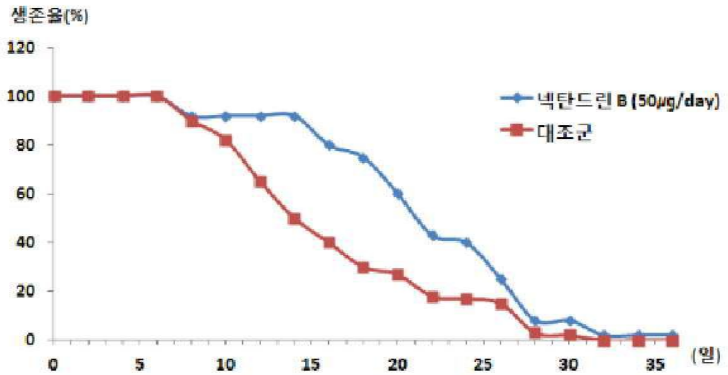


1. Tetrahydrofuroguaiacin B
2. Saucernetindiol
3. Verrucosin
4. Nectandrin B
5. Nectandrin A
6. Fragransin C1

도면2



도면3



도면4

