



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0149077
(43) 공개일자 2016년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/19 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/191 (2006.01) A61K 31/192 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/19 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0086100

(22) 출원일자 2015년06월17일

심사청구일자 2016년07월25일

(71) 출원인

대한민국(농촌진흥청장)

전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이성현

전라북도 완주군 이서면 반교로 21 남양사이버
107동 903호

이성준

서울특별시 강남구 도산대로 96길 39,104동 402
호(청담동, 청담공원아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

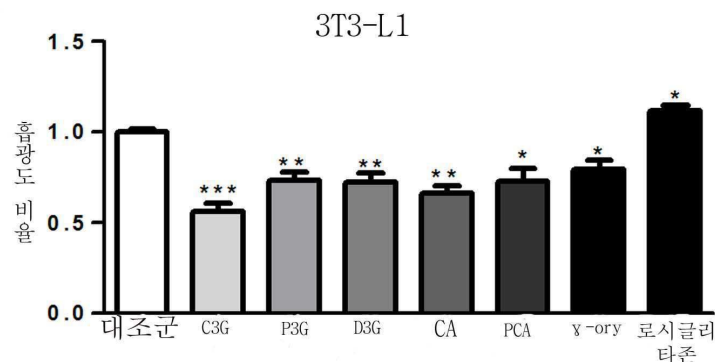
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 흑미 호분층에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 흑미 호분층에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 흑미 호분층에서 6종의 화합물을 분리하였고, 이들 화합물을 지방세포에 처리하여 배양하였을 경우 지방세포의 분화를 억제함으로써 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A61K 31/191 (2013.01)
A61K 31/192 (2013.01)
A61K 36/899 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

(72) 발명자

안영재

전라북도 김제시 요촌서길 30

김연지

서울특별시 동대문구 약령시로 25 안암벽산아파트
 106동 1201호

김정봉

대전광역시 유성구 원신흥동 봉명로 94 금성백조예
 미지아파트 708동 1602호

조용식

전라북도 전주시 완산구 문학대4길 3, 201호

이영민

경기도 수원시 권선구 서호로 30(서둔동)

장환희

전라북도 전주시 완산구 소태정로 1 휴먼시아아
 린 407동 402호

남송이

인천광역시 남동구 논고개로 10. 한화에코메트로
 1212동 804호

김남석

전라북도 전주시 덕진구 가리내로 550 한양아파트
 110동 708호

최봉겸

전라북도 전주시 완산구 물레방아3길 25-18

이선혜

전라북도 전주시 덕진구 태진로 101 우성아파트
 108동 1201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01009001

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 농축산물부가가치향상 기술개발

연구과제명 뼈 건강과 비만을 동시에 조절하는 건강기능성 원료 등록 연구(흑미의 *invivo* 뼈 건강과
 비만 동시조절 개선 기전 연구)

기 여 율 1/1

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2014.02.01 ~ 2015.12.31

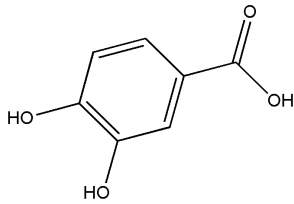
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 흑미 호분층에서 분리된 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

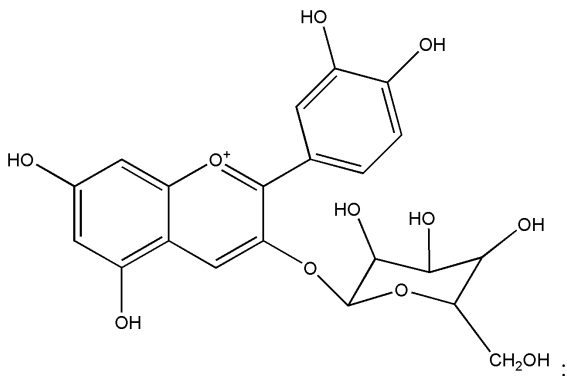
청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 지방세포 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

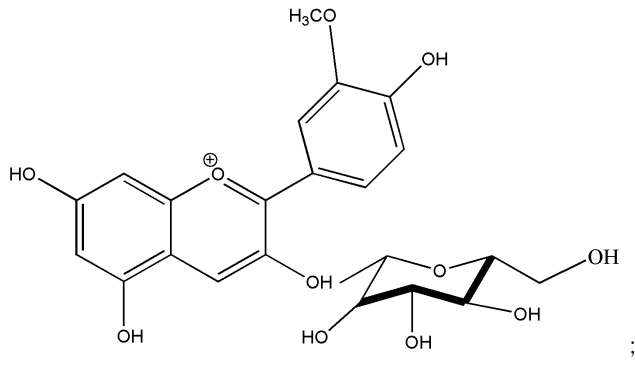
청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물에 하기 화학식 2 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물:

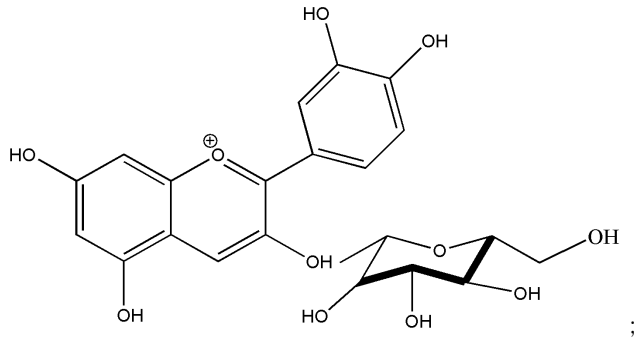
[화학식 2]



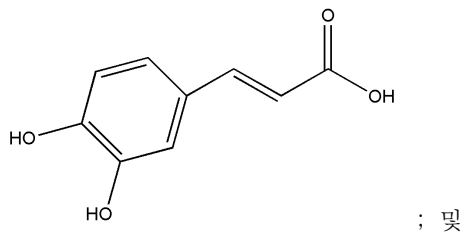
[화학식 3]



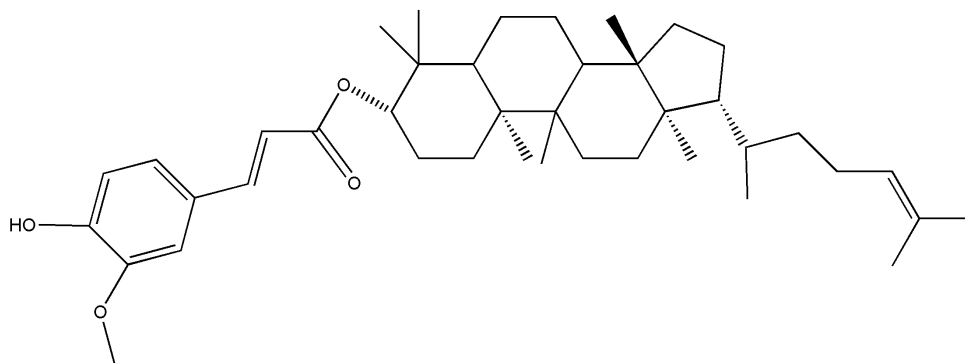
[화학식 4]



[화학식 5]



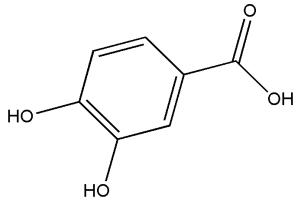
[화학식 6]



청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 화합물은 흑미 호분층에서 분리된 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 건강기능식품.

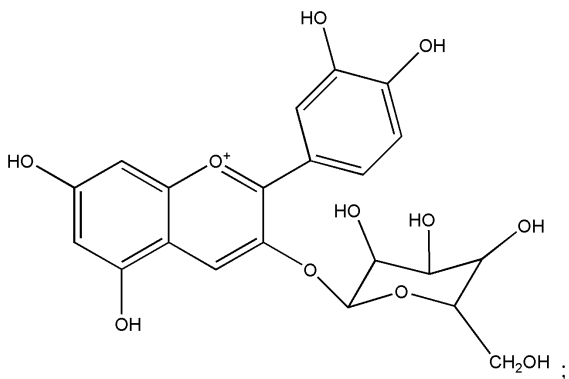
청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 건강기능식품은 지방세포 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 건강기능식품.

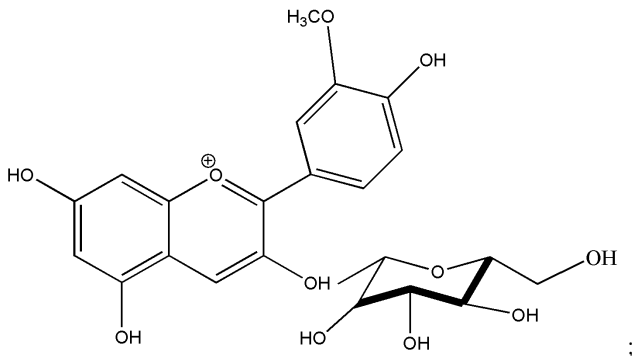
청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 건강기능식품은 하기 화학식 2 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 건강기능식품:

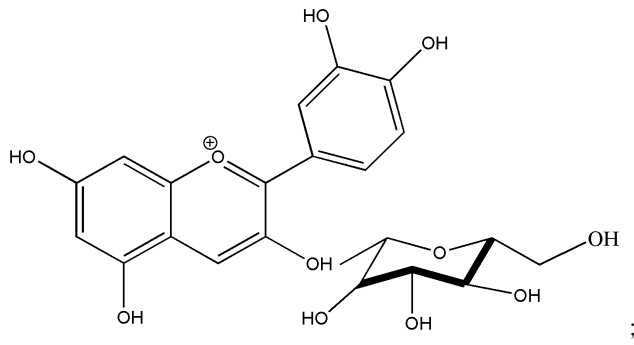
[화학식 2]



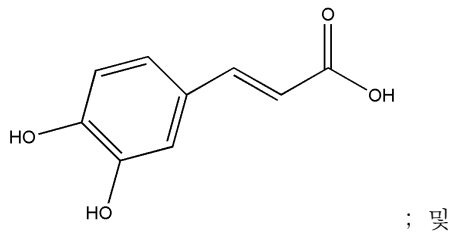
[화학식 3]



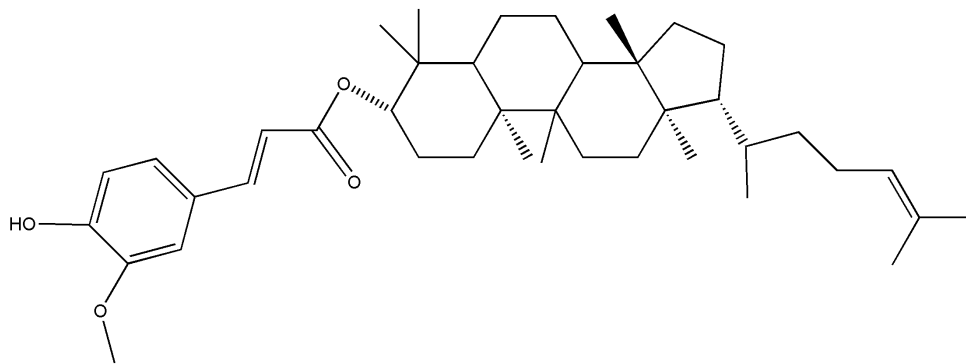
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



청구항 9

흑미 호분층에서 분리한 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

흑미 호분층에서 분리한 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 흑미 호분층에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만(obesity)은 건강에 악영향을 미칠 정도로 체내에 지방이 필요 이상으로 과도하게 쌓인 경우를 이르는 말로

병리학적으로는 세계 보건 기구에서 정한 체질량지수(body mass index)가 30 이상인 경우에 비만증이라고 일컫는다. 지방은 몸 속에 저장되어 있어 직접적으로 측정될 수 없으므로, 체질량지수, 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리 엉덩이 둘레비 등의 지표들로 체지방을 추정한다. 비만은 그 자체로는 문제가 되지 않으나, 제2형 당뇨병, 심혈관 질환, 특정 암의 발생 증가, 폐쇄성 수면 무호흡증과 같은 호흡기 합병증, 관절염 등과 같은 합병증과 연관되어 문제를 일으킨다.

[0003] 고혈압은 비만과 연관된 가장 흔한 질환 중 하나로서 고혈압의 위험은 정상 체중인 사람보다 비만에서 5배 더 높다. 고혈압 환자의 60%가 체중과다이고, 고혈압 환자의 85% 이상이 체질량지수 25 kg/m^2 이상이라고 보고된 바 있으며, 비만에서 혈압이 상승되는 것은 부분적으로 비만세포에서 안지오텐시노겐이 분비되고 체질량지수 증가와 관련된 혈액량과 혈액 점도의 증가 때문이다. 또한 암 유병률은 정상 체중인 성인에 비해, 비만 남성에서 1.33배, 비만 여성에서 1.55배 더 증가하며, 세계보건기구의 국제 암 연구 협회는 비만과 활동량 감소는 유방암, 대장암, 자궁내막암, 신장암, 식도암의 위험을 높인다고 하였다. 호흡기 질환 환자는 체중의 증가로 호흡곤란이 악화될 수 있고 흉부와 복부의 지방이 폐활량을 제한할 수 있으며, 비만한 환자는 마취 후에 무기폐와 폐렴과 같은 호흡기 합병증이 쉽게 발생한다.

[0004] 지방의 축적은 지방세포(adipocytes)의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)을 초래하여 비만을 포함한 대사증후군(metabolic syndrome)의 발병에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 지방세포의 비대는 분화된 세포 내의 활성화된 지방질 생합성(lipogenesis) 작용에 의하여 생성된 지방구 축적에 의하여 유도된다. 반면 지방세포 과형성은 전지방세포(preadipocytes)의 활발한 증식과 활성화된 지방세포 분화 과정으로 인하여 발생한다. 지방세포의 과형성은 운동이나 에너지 섭취를 조절하여 제어하기는 어려운 비가역적인 과정으로 알려져 있으며, 지방세포에 관여하는 특이적인 전사인자의 발현과 활성화, 그리고 신호전달 과정의 상호작용으로 유도된다. 그러므로 활성화된 지방세포 분화(adipogenesis)는 지방세포의 과형성 뿐만 아니라 비대화 능력(hypertrophy capacity) 결정에 중요한 요소로 작용하므로 비만 억제에 있어서 효율적인 타깃으로 연구되고 있다. 또한 전지방세포가 성숙한 지방세포로 분화할 때 NADPH 산화효소(NADPH oxidase, NOX)와 같은 산화효소의 발현이 증가하게 되어 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하여 산화적 스트레스를 유발하게 된다. 이로 인하여 증가된 활성산소종은 단백질 변성, 지질과산화물 생성, DNA 변이를 일으켜 노화와 암을 유발시킨다.

[0005] 현재 FDA(Food and Drug Administration)의 승인을 받은 비만 치료의 대표적인 약물인 시부트라민(sibutramine)과 오르리스타트(orlistat)의 경우 의약품으로 부작용이 존재할 수 있기 때문에 당뇨, 고혈압, 이상지방혈증 등을 포함한 위험인자가 있는 비만 환자를 제외한 일반적인 과체중을 포함한 비만 환자에게 이용되기 어려운 문제점이 있다. 합성 항산화제의 경우도 경제적이며 효과가 좋다는 이점에도 불구하고 안전성의 문제로 사용이 제한되었다. 따라서 사용시 부작용이 적고 효과가 좋은 천연 물질에 대한 연구의 필요성이 제기되고 있다.

[0006] 비만과 관련이 있는 지방세포는 평소 전지방세포의 상태로 존재하다가 분화 유도 물질을 처리하게 되면 분화가 유도되어 지방세포가 되며 세포 내에 지방을 축적하는 특징이 있다. 따라서 전지방세포의 분화 및 지방세포 내의 지방 생성을 억제하는 물질은 비만을 예방하거나 억제한다고 보고되고 있다.

[0007] 흑미(*Oryza sativa*, black rice)는 원시벼의 일종으로 중국이 주요 산지이며 2000년 이상의 역사를 가지고 있다. 항산화, 항암 및 항괴양 효과가 있다고 알려진 안토시아닌이라는 수용성 색소가 있어 검은색을 띠게 되며, 흑미에는 안토시아닌이 검은콩보다 4배 이상 들어 있으며, 비타민 B군을 비롯하여 철, 아연, 셀레늄 등의 무기염류는 일반 쌀의 5배 이상 함유되어 있다. 이것은 노화와 여러 질병을 일으키는 체내의 활성산소를 효과적으로 중화시킬 뿐만 아니라 심장질환, 뇌졸중, 성인병, 암 예방에도 좋은 성분으로 알려져 있다.

[0008] 이에 본 발명자들은 부작용이 없으면서 비만을 예방할 수 있는 천연 물질을 연구하던 중, 흑미 호분층에서 6종의 화합물을 분리하여 지방세포에 처리한 결과, 상기 6종의 화합물이 지방세포의 분화를 억제하여 비만 예방 및 치료 용도로 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

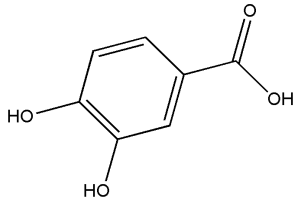
해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 흑미 호분층에서 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

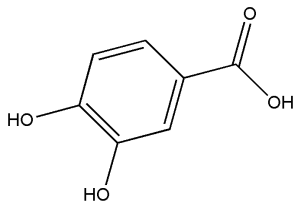
[0011] [화학식 1]



[0012] .

[0013] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[0014] [화학식 1]



[0015] .

[0016] 또한, 본 발명은 흑미 호분층에서 분리한 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 흑미 호분층에서 분리한 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 흑미 호분층에서 분리한 6종의 화합물은 지방세포에 처리하여 배양하였을 경우 지방세포의 분화를 억제함으로써 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1a는 3T3-L1 지방세포에 흑미 호분층에서 추출한 화합물을 처리한 후 지방세포의 분화 정도를 측정한 도이다:

C3G: 시아니딘 3-글루코시드(cyanidin 3-glucoside);

P3G: 피오니딘 3-글루코시드(peonidin 3-glucoside);

D3G: 델피니딘-3-글루코시드(delphinidin 3-glucoside);

CA: 카페인산(caffeic acid);

PCA: 프로토크테퀴산(protocatechuic acid); 및

γ -ory: 감마-오리자놀(γ -oryzanol).

도 1b는 C₃H₁₀T₁/2 지방세포에 흑미 호분층에서 추출한 화합물을 처리한 후 지방세포의 분화 정도를 측정한 도이다:

C3G: 시아니딘 3-글루코시드(cyanidin 3-glucoside);

P3G: 피오니딘 3-글루코시드(peonidin 3-glucoside);

CA: 카페인산(caffeic acid); 및

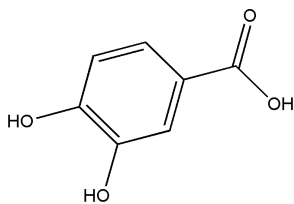
γ -ory: 감마-오리자놀(γ -oryzanol).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

화학식 1



[0022]

[0023] 상기 화합물은 흑미 호분층 추출물에서 분획물을 수득한 뒤 이로부터 분리된 것이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 당업계에서 잘 알려진 통상의 방법으로 합성될 수 있다.

[0024] 상기 흑미 호분층 추출물은 하기의 단계를 포함하는 제조방법으로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다:

[0025] 1) 흑미 호분층에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0026] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0027] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하여 흑미 호분층 추출물을 제조하는 단계.

[0028] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 흑미는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

[0029] 상기 방법에 있어서, 흑미 호분층 추출물의 추출 방법으로는 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류냉각 추출 및 초음파추출 등 당업계에 공지된 모든 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 흑미 호분층 분량의 1 내지 40 배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20 내지 50℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 100 시간인 것이 바람직하며, 6 내지 72 시간이 더욱 바람직하고, 12 내지 36 시간이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

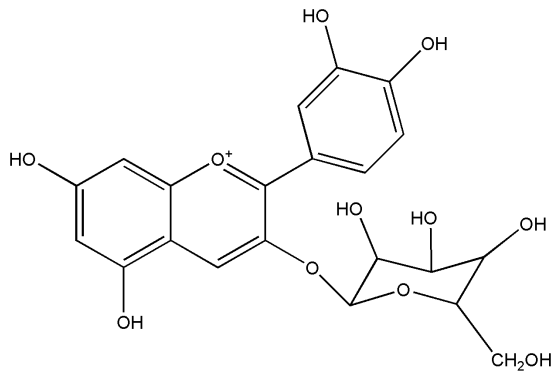
[0030] 또한, 상기 방법에 있어서, 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0031] 상기 조성물은 지방세포 분화를 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0032] 상기 조성물은 하기 화학식 2 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의

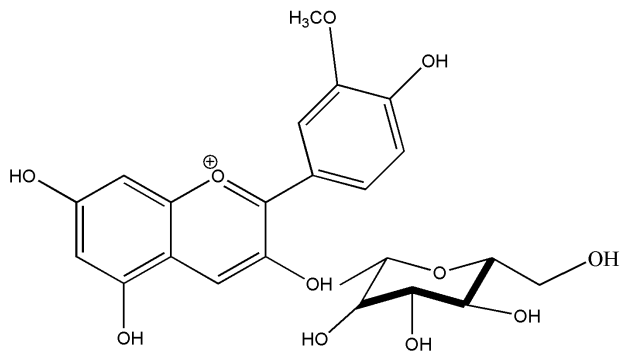
화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다:

화학식 2



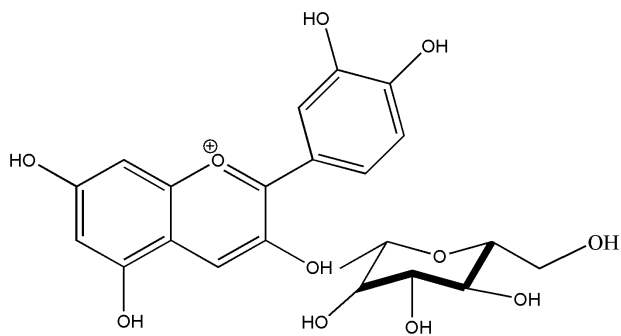
[0033]

화학식 3



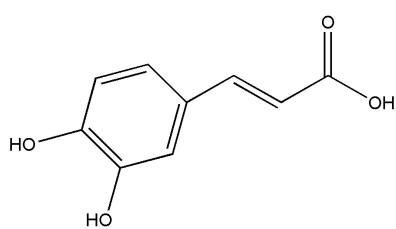
[0034]

화학식 4



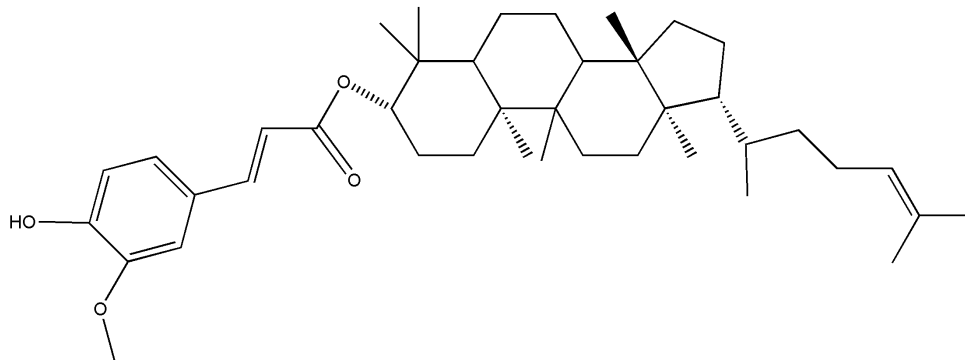
[0035]

화학식 5



[0036]

화학식 6



[0037]

[0038]

본 발명의 구체적인 실시예에서, 흑미 호분층에서 분리한 6종의 화합물을 3T3-L1 및 C3H10T1/2 세포에 처리하여 배양하였을 경우 지방세포로의 분화를 억제하는 효과가 있음을 확인하였으므로 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다(도 1 참조).

[0039]

본 발명의 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 술폰산류와 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0040]

본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0041]

또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0042]

나아가, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 이성질체 등을 모두 포함한다.

[0043] 본 발명의 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 화학식 1의 화합물을 0.1 내지 99.9 중량%를 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용액, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다.

[0045] 비수용성제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

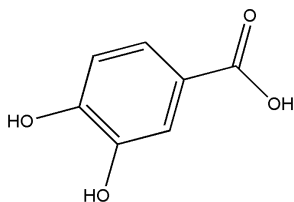
[0046] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용 또는 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 피부외용으로 사용한다.

[0047] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 화학식 1의 화합물의 양을 기준으로 0.01 내지 1000 mg이고, 바람직하게는 30 내지 500 mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50 내지 300 mg/kg이며, 하루 1 내지 6회 투여될 수 있다.

[0048] 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[0050] [화학식 1]



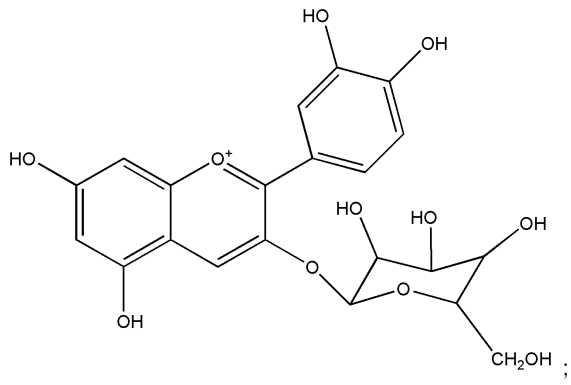
[0051]

[0052] 상기 화합물은 흑미 호분층 추출물에서 분획물을 수득한 뒤 이로부터 분리된 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않으며, 당업계에 잘 알려진 통상의 방법으로 합성하여 제조될 수 있다.

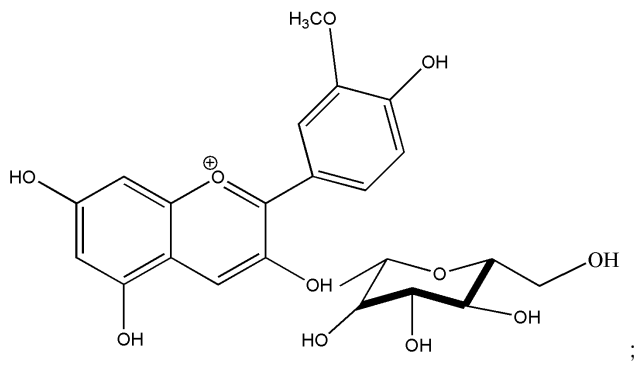
[0053] 상기 건강기능식품은 지방세포 분화를 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0054] 상기 건강기능식품은 하기 화학식 2 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 화합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다:

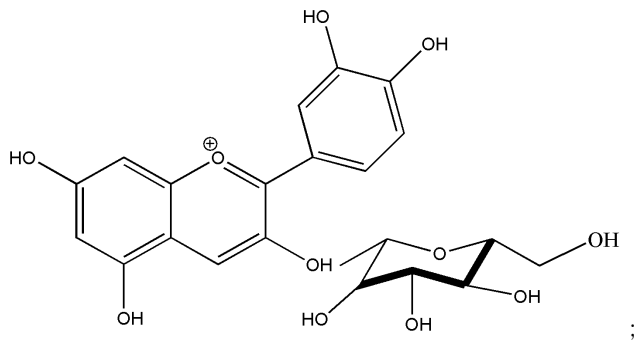
[0055] [화학식 2]



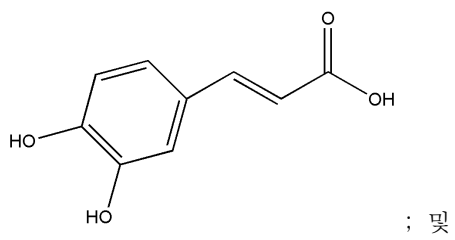
[0057] [화학식 3]



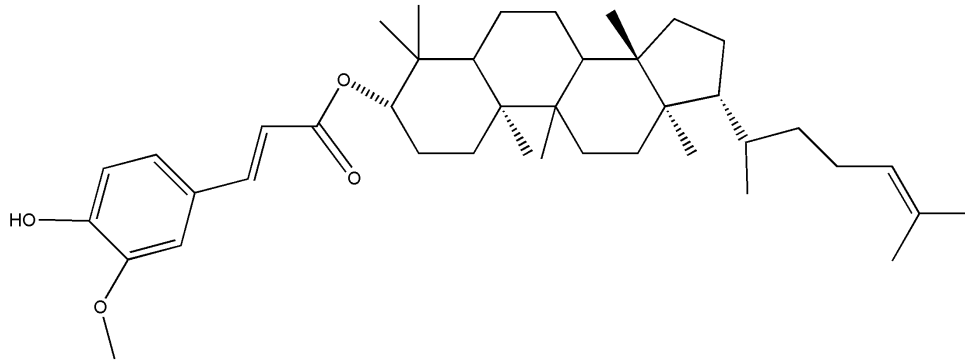
[0059] [화학식 4]



[0061] [화학식 5]



[0063] [화학식 6]



[0064]

[0065]

본 발명의 구체적인 실시예에서, 흑미 호분층에서 분리한 6종의 화합물을 3T3-L1 및 C3H10T1/2 세포에 처리하여 배양하였을 경우 지방세포로의 분화를 억제하는 효과가 있음을 확인하였으므로 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다(도 1 참조).

[0066]

본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 100 중량부당 0.01 ~ 0.04 중량부, 구체적으로는 약 0.02 ~ 0.03 중량부 범위에서 선택할 수 있다.

[0067]

상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0068]

본 발명은 흑미 호분층에서 분리한 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0069]

본 발명은 흑미 호분층에서 분리한 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0070]

이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0071]

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0072]

<실시예 1> 흑미 호분층 추출물 제조

[0073]

흑미는 진도에 소제한 흑미 정미소에서 구입하였고, 도정기를 이용하여 쌀겨 제거방법과 같은 방법으로 흑미 현미를 10도미까지 절삭해서 흑미의 약 8% 되는 흑미 호분층을 분리하였다. 준비된 흑미 호분층을 50%와 70%의 주정 수용액에 40℃ 조건에서 48시간 추출하였고, 50℃, 0.1 내지 0.5 기압 조건에서 최초 추출액의 10%로 감소될 때까지 감압 농축하였다.

[0074]

<실시예 2> 흑미 호분층에서 화합물의 확인

[0075] 흑미 호분층에서 유효성분을 선정하고, 흑미 호분층 추출물에 포함된 화합물은 가스 크로마토그래피-비행시간-질량분석기(gas chromatography-time of flight-mass spectrometry, GC-TOF-MS) 및 초고성능 액체 크로마토그래피(ultra performance liquid chromatography, UPLC)를 이용하여 분석하였다.

[0076] <2-1> 흑미 호분층의 유효성분 선정

[0077] 흑미 호분층의 유효성분을 선정하기 위해 문헌조사를 실시하였으며, 일반미 대비 흑미에 특이적으로 함유되어 있는 유효성분 리스트를 확보하였다(표 1, Kim et al, 2013). 선정된 흑미 호분층 유효성분은 시아니딘-3-글루코시드, 피오니딘-3-글루코시드, 카페인산 및 프로토크아테큐산이며, 이외에 흑미에 포함되어 있다고 알려진 안토시아닌계의 화합물인 델피니딘-3-글루코시드와 흑미 찻겨에 포함된 유효성분인 감마 오리자놀을 포함하여 총 6종의 유효성분을 선정하였다(Metabolic profiling and biological mechanisms of body fat reduction in mice fed the ethanolic extract of black-colored rice, Kim et al, 2013).

표 1

	대조군	흑 미
페놀산(phenolic acid)		
살리실산(Salicylic acid)	0.24 ± 0.01	0.40 ± 0.04
4-하이드록시벤조익산(4-Hydroxybenzoic acid)	0.46 ± 0.01	0.98 ± 0.07
바닐산(Vanillic acid)	0.19 ± 0.02	9.90 ± 0.42
시링산(syringic acid)	0.06 ± 0.00	0.79 ± 0.07
쿠마릭산(p-Coumaric acid)	0.06 ± 0.00	1.42 ± 0.43
3,4-하이드록시벤조익산(3,4-Dihydroxybenzoic acid)	1.40 ± 0.59	160.37 ± 16.80
페룰산(Ferrulic acid)	2.13 ± 0.12	17.63 ± 3.18
시나핀산(sinapic acid)	0.53 ± 0.12	19.74 ± 10.30
카페인산(caffeic acid)	33.69 ± 0.96	325.06 ± 19.86
안토시아닌(anthocyanins)		
시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside)	비검출	303.33 ± 2.89
피오니딘-3-글루코시드(peonidin-3-glucoside)	비검출	10.93 ± 2.57

[0079] <2-2> 도정별 성분 함량의 비교

[0080] 백미, 현미 및 호분층에 포함된 시아니딘-3-글루코시드 및 피오니딘-3-글루코시드의 함량을 분석하였다.

[0081] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 호분층에 포함된 시아니딘-3-글루코시드 함량은 백미 및 현미와 비교하여 약 240배 및 5.5배 많았으며, 피오니딘-3-글루코시드의 함량은 현미와 비교하여 약 4배 정도 많은 것을 확인할 수 있었다(표 1).

표 2

(단위: mg/g)	백미	현미	호분층
시아니딘-3-글루코시드	0.03	1.3	7.18
피오니딘-3-글루코시드	-	0.43	1.79
전 체	0.03	1.73	8.97

[0083] <2-3> 페놀산 화합물의 분석

[0084] 흑미 호분층에 포함된 페놀산 화합물을 하기와 같이 분석하였다.

[0085] 구체적으로, 상기 <실시예 1>의 흑미 호분층 추출물, 0.01 ~ 50 µg/ml의 페놀산 표준용액 및 내부 표준물질(Internal standard)인 3,4,5-trimethoxycinnamic acid(25 µg/ml) 50 µl와 혼합하였다. 이 혼합물을 30℃에서 4시간동안 2 M의 수산화나트륨(NaOH)로 가수분해한 후, 2M 염산을 이용하여 pH 범위(1.5~2.0)를 조정하였다. 상기 혼합물을 에틸 아세트산으로 3번 추출한 뒤 센트리-랩(Centri-Vap, Labconco Co., Kansas City, 미국)을 이용하여 10시간 동안 건조시킨 후, 1% TBDMCS가 포함된 MTBSTFA 40 µl 및 피리딘(pyridine) 40 µl를 섞은 혼합액에 건조된 추출물 섞어 유도체화 하였다. GC-TOF-MS 분석 전에 유도체화한 시료는 60℃에서 30분 동안 가

열하였으며 10분간 냉각시켰다.

[0086] GC-TOF-MS 분석은 Agilent 6890N GC(Agilent, Palo Alto, 미국)에 연결된 페가수스 III 비행시간 질량분석기(Pegasus III time-of-flight(TOF) mass spectrometry)(Leco, St. Joseph, 미국)에 DB-5MS 컬럼을 장착하여 사용하였다. GC-TOF-MS는 전자 이온화(electron ionization) 모드로 실시하였고, 오븐 온도는 150℃에서 2분간 유지시킨 후 150℃에서 320℃까지 분당 15℃의 속도로 증가시키고 나서 10분간 유지시켰다. 주입기(Injector) 및 검출기 전달 라인(detector transfer line)의 온도는 각각 230℃ 및 250℃이고, 운반가스는 분당 1.0 ml의 고정 유속(constant flow rate)으로 헬륨(He)을 사용하였다. 검출기의 전압은 70eV이었고 MS 스펙트라는 m/z 85-700 질량범위에서 얻었으며, 분할율은 1:10이었다. 흑미 추출물에 포함된 페놀산은 페놀산 표준용액들과의 지연시간 및 질량 스펙트라를 비교하여 확인하였다. 추출물 시료의 페놀산 함량은 내부 표준물질의 피크영역을 기준으로 상대적 양을 계산하였으며, 각각의 시료는 3회 반복 분석하였다.

[0087] <2-4> 안토시아닌 화합물의 분석

[0088] 안토시아닌 화합물의 분석을 위해 상기 <실시예 1>의 흑미 호분층 추출물, 시아니딘-3-글루코시드(Cyanidin-3-glucoside, C3G) 및 피오니딘-3-글루코시드(Peonidin-3-glucoside, P3G) 표준 용액을 1.56 내지 200 µg/ml의 농도 범위로 준비한 뒤 0.2 µm 막 실린지 필터(membrane syringe filter)를 이용하여 여과하였다. 안토시아닌의 정량 분석은 초고성능 액체 크로마토그래피-광다이오드 어레이(UPLC-photodiode array(PDA)(Waters Acquity, Milford, 미국)를 이용하였다. UPLC를 이용한 분석은 BEH C18 컬럼(2.1 x 100 mm i.d. 1.7 µm, Waters acquity)을 사용하여, 이동상의 유속은 0.35 ml/min, 컬럼의 온도는 35℃, 시료 주입량은 1 µl 및 파장은 530 nm에서 시행하였다. 안토시아닌 분리는 이동상 용매 A(Trifluoroacetic acid (TFA)가 0.1% 함유된 물) 및 용매 B(TFA가 0.1% 함유된 메탄올)를 다음과 같은 농도 구배 조건으로 총 분석시간은 10.4분으로 설정하였다. 이동상 용매 A와 B의 비율은 85% 용매 A를 시작으로 하여 0.4분까지 80%로, 8.5분까지는 70%로 단계적으로 낮추면서 용매 B의 비율을 상대적으로 증가시켰다. 그 이후 0.5분까지는 용매 A의 비율을 85%로 다시 증가 시켰고, 1분 동안 85%로 유지시켰다. 시료의 안토시아닌 함량 분석은 표준물질의 피크 면적을 이용한 회귀 분석을 통해 생성된 검량선을 통해 계산하였으며, 각각의 시료는 3회 반복 분석하였다.

[0089] <실험예 1> 흑미 호분층에 함유되어 있는 화합물의 지방세포 분화 조절 효과 확인

[0090] 상기 <실시예 2>에서 확인한 화합물의 지방세포 분화 조절 효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

[0091] <1-1> C3H10T1/2 및 3T3-L1의 배양과 지방분화세포로의 분화 유도

[0092] 마우스 중간엽 줄기세포인 C3H10T1/2 세포주 및 마우스 지방전구세포 3T3-L1 세포주는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB, 대한민국)에서 분양 받아 실험을 진행하였으며, 세포 배양을 위하여 DMEM high glucose 배지(Hyclone, USA)에 10% 비활성화 소태아 혈청(Hyclone, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액(Hyclone, 미국)을 첨가하여 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. 세포 유지를 위해서 이틀마다 배지를 교체해 주었고, 세포 밀도가 60% 이전에 계대배양을 실시하여 분화 능력을 유지하도록 하였다.

[0093] 그 후 C3H10T1/2 세포를 지방세포로 분화시키기 위하여 세포를 24-웰 플레이트(24-well plate)에 웰(well)당 2×10^5 농도로 분주하여 24시간 배양한 후, 1 µm 로지글리타존(Cayman Chemical, 미국), 1 µm 텍사메타존(Cayman Chemical, 미국) 및 5 µg/ml 인슐린(Welgene, 대한민국)이 첨가된 분화 배지에 시아니딘-3-글루코시드, 프로토카테큐산, 카페인산 및 감마 오리지놀을 40 µM의 농도로 처리하였다. 음성대조군으로 분화배지에 로지글리타존을 처리하지 않고 분화를 유도하였으며, 2일마다 배양액을 갈아주며 9일 동안 분화시켰다.

[0094] 3T3-L1 세포를 지방세포로 분화시키기 위하여 세포를 96-웰 플레이트(96-well plate)에 웰당 2×10^4 농도로 분주하여 24시간 배양한 후, 10 µg/ml 인슐린, 1 µm 텍사메타존 및 0.518 µM 3-이소부틸-1-메틸잔틴(IMBX)가 첨가된 분화 배지에 시아니딘-3-글루코시드, 피오니딘-3-글루코시드, 텔피니딘-3-글루코시드, 프로토카테큐산, 카페인산 및 감마 오리지놀을 40 µM의 농도로 처리하였다. 양성대조군으로 분화배지에 로지글리타존을 10 µM의 농도로 처리하여 분화를 유도하였으며, 2일마다 배양액을 갈아주며 8일 동안 분화시켰다.

[0095] 화합물은 시중에서 판매하는 것을 구입하여 사용하였으며, 시아니딘 3-글루코시드(cyanidin 3-glucoside, CAS

No. 7084-24-4, Product code P2102, TOKIWA Phytochemical, 일본), 피오니딘 3-글루코시드(peonidin 3-glucoside, CAS No. 6906-39-4, Product code P2104, TOKIWA Phytochemical, 일본), 델피니딘-3-글루코시드(delphinidin 3-glucoside, CAS No. 68852-84-6, Product code P2115, TOKIWA Phytochemical, 일본), 카페인산(caffeic acid, CAS No. 331-39-5, Product code 70602, Cayman Chemical, 미국), 프로토크테퀴산(protocatechuic acid, CAS No. 99-50-3, Product code 37580, Sigma Aldrich, 미국) 및 감마-오리자놀(γ -oryzanol, CAS No. 11042-64-1, Product code 00172, TOKYO Chemical industry, 일본)을 구입하여 사용하였다.

[0096] <1-2> 흑미 호분층에 함유되어 있는 화합물의 지방세포 분화 조절능력 확인

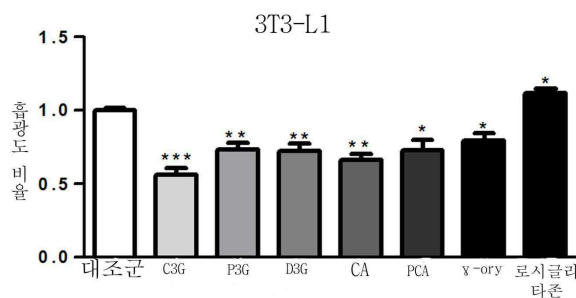
[0097] 상기 실험에 <1-1>의 세포에서 지방세포로의 분화정도를 오일-레드 오(Oil-Red-O) 염색으로 확인하였다.

[0098] 구체적으로, C3H10T1/2 및 3T3-L1 세포에 흑미 유효성분들을 40 μ m의 농도로 처리한 후 각각 분화 9일차와 8일차에 모든 플레이트의 배지를 제거하고 차가운 인산완충식염수(PBS)로 세포를 세척하였다. 그 후, 10% 포르말린을 처리하여 실온에서 5분간 방치한 후 제거하고, 동량의 10% 포르말린을 재처리하여 1시간동안 실온에서 고정시켰다. 포르말린을 완전히 제거한 다음 60% 이소프로판올로 행군 뒤, Oil-Red-O 분말이 이소프로판올에 0.5% 비율로 녹아있는 시약(Sigma aldrich, 미국)을 증류수에 6 : 4의 비율로 희석 및 여과한 오일-레드-오 용액을 넣고 실온에서 1시간 염색하였다. 염색 후, 오일-레드-오 용액을 완전히 제거하고, 증류수로 4회 세척한 뒤 현미경으로 세포의 염색 상태를 확인하였다. 세포 내 축적된 지질을 정량하기 위하여 100% 이소프로판올을 처리하여 염색된 오일-레드-오 용액을 모두 용출시킨 후 Model 680 Microplate reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0099] 그 결과 도 1a에 나타난 바와 같이, 3T3-L1 세포에서는 처리한 6종의 화합물 모두 지방세포로의 분화를 억제하는 것을 확인하였고(도 1a), 도 1b에 나타난 바와 같이 C3H10T1/2 세포에서는 시오니딘 3-글루코시드(C3G), 프로토크테퀴산(PCA), 카페인산(CA) 및 감마-오리자놀(γ -ory)이 지방세포로의 분화를 억제하는 것을 확인하였다(도 1b).

도면

도면1a



도면1b

