



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0123130
(43) 공개일자 2016년10월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/28 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/28 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2015-0053289
(22) 출원일자 2015년04월15일
심사청구일자 2015년04월15일
- (71) 출원인
원광대학교산학협력단
전라북도 익산시 익산대로 460 (신동)
재단법인 순창군건강장수연구소
전라북도 순창군 인계면 인덕로 427-128 ()
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
이영미
전라북도 익산시 선화로10길 17, 109동 2101호 (모현동1가, 익산e편한세상)
김영호
대전광역시 유성구 봉명로 48 (원신흥동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김순용

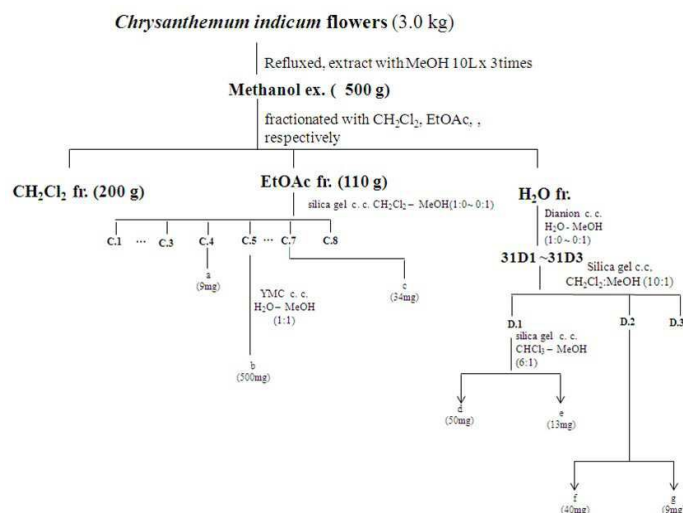
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비만 발현 인자인 PPAR-g 및 C/EBP pathway 단백질 발현량을 감소시키고, 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제하며, 혈중 렙틴(leptin) 발현량을 감소시키고 아디포넥틴(adiponectin) 발현량을 증가시켜 우수한 항비만 효능 뿐 아니라 간 지질 침착 감소 효능을 가지는 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)
A61K 2236/33 (2013.01)
A61K 2236/35 (2013.01)

(72) 발명자

김대기

전라북도 전주시 완산구 서신로 90, 101동 901호
 (서신동, 현대아파트)

문광현

도 순창군 순창읍 장류로 296, 703호 (대신파크맨
 션)

차지윤

광주광역시 광산구 첨단중앙로181번길 42-25, 104
 동 1305호 (월계동, 선경아파트)

송승한

전라북도 군산시 백토로 230, 101동 1306호 (나운
 동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-0826

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학협력 선도대학(LINC) 육성사업

연구과제명 [대응-순창군]산학협력 선도대학(LINC) 육성사업

기 여 율 1/1

주관기관 원광대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.07.28

명세서

청구범위

청구항 1

감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 감국 추출물 또는 분획물은

(a) 감국을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매 중 선택된 어느 하나 이상의 용매로 추출하여 감국 추출물을 얻는 단계; 및

(b) 상기 감국 추출물에 증류수를 가하고 유기용매를 이용하여 순차적으로 분획하여 각 용매 분획물을 얻는 단계;

로 제조되는 것을 특징으로 하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 (a) 단계의 탄소수 1 내지 4의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올 및 부탄올 중 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 (b) 단계의 유기용매는 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 물 중 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 감국 분획물은 에틸아세테이트 분획물, 물 분획물 및 이들의 혼합물 중 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 감국 분획물은 퀘세틴(quercetin), 1,3-디카페오일퀴닌산 (1,3-dicaffeoylquinic acid), 메틸 3,4-디-O-카페오일 퀴네이트(mehtyl 3,4-di-O-caffeoyl quinate), 클로로제닌산(chlorogenic acid), 디하이드로시린진(dihydrosyringin) 및 벤질-β-D-글루코피라노사이드(benzyl-β-D-glucopyranoside) 중 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 감국 추출물 또는 분획물은 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 감국 추출물 또는 분획물은 비만 발현 인자인 PPAR-g 및 C/EBP pathway 단백질 발현량을 감소시키며, 지방 전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제하며, 혈중 렙틴(leptin)의 발현량을 감소시키며, 아디포넥틴(adiponectin)의 발현량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 감국 추출물 또는 분획물은 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 우수한 항비만 효능 뿐 아니라 지질 침착 감소 효능을 가지는 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 식생활 환경의 향상과 더불어 영양 섭취가 양호해지면서 사람들의 평균 수명이 연장되고 있으나, 식생활의 서구화, 음식의 과다 섭취, 육체적 운동 부족 등으로 말미암아 비만 환자가 매년 급속히 증가되고 있다.
- [0003] 비만은 주요 성인병들의 위험요소(risk factor)로, 고혈압, 당뇨, 동맥경화증, 뇌졸중, 심장마비, 각종 종양 등과 같은 성인병의 발생에 관여하고 병의 진행을 촉진시키기도 하는데, 비만은 단순히 외모상의 문제만이 아니라 건강에 직결되는 중대한 문제가 아닐 수 없다.
- [0004] 이러한 비만의 예방은 현 상태의 식사량은 유지하면서 운동량을 늘리는 것이 중요하며, 비만이 되었을 경우에는 원인을 파악하고 거기에 맞는 적절한 식이요법을 통하여 적정 체중을 유지하면서, 신체가 정상적인 신진대사를 할 수 있도록 하는 것이 바람직하다.
- [0005] 비만이 현대사회의 문제로 대두되면서, 다이어트란 말은 현대를 살아가는 많은 사람들에게 관심을 끌고 있다. 비만자들이 체중감량에 기울이는 관심과 노력이 높다는 점을 이용하여 지금까지 소개된 수많은 다이어트 방법들이 있는데, 단식 및 금식, 야채효소, 지방 흡입술, 설사약, 이뇨제 등이 있다.
- [0006] 그러나, 다이어트에 대한 정확하고 과학적인 원인 파악 및 인체 신진대사의 기전과 영양 생리학적으로의 접근은 등한시한 채, 무분별하게 체중감량의 효과에만 치중함으로써, 영양소 섭취의 불균형을 초래하게 되어 신진대사가 정상적으로 이루어지지 못한 문제점이 있다.
- [0007] 한편, 체중감량을 위한 방법으로 암페타민 유도제 등 식욕억제제를 이용한 약물요법이 있는데, 이러한 약물요법은 식욕억제 능력이 지속되지 못하고 일시적인 작용으로 두통, 불면증, 혈압상승, 초조, 긴장감, 환각증세, 현기증, 시력 저하 등의 부작용을 유발시키는 문제점이 있다.
- [0008] 또한 이뇨제를 사용하여 체중을 감량 및 조절하는 경우도 있으나, 이 방법 또한 신장에 대한 중독성과 심장마비, 구토 등을 수반하는 부작용을 일으키는 문제점이 있다.
- [0009] 이 외에도 뇌의 중추에 작용하여 식욕을 억제하게 하는 중추성 식욕 억제제가 있는데, 이는 감량효과는 뛰어나지만 어느 정도 시간이 지나면 약에 대한 내성이 생겨서 이후에는 몸무게가 거의 줄지 않으며, 두통, 불면증,

어지러움 등의 부작용을 초래하는 경우가 많다.

[0010] 현재 비만치료제로 널리 사용되어지는 식욕억제제의 경우, 뇌의 시상하부에 작용하여 식욕억제로 인한 체중 감량 효과를 나타내는 작용기전을 가지고 있으며, 이들 대부분은 중추 신경 흥분을 유발시켜 이의 작용을 유발하는 것으로 알려져 있다. 국내에서 대표적인 식욕억제제로 사용중인 시부트라민(Sibutramine, 상품명; 리덕틸)은 식욕 조절에 작용하는 신경호르몬인 세로토닌(Serotonin)과 noradrenaline의 재흡수를 동시에 억제시켜 식욕을 떨어뜨리는 약물이다. 그러나 이들 대부분의 식욕억제제의 경우, 교감 신경을 흥분시켜 혈압이나 심박출량이 증가하게 되고, 결과적으로 심혈관계 환자에게 이들 약물 복용은 금기시 되고 있다. 또한 일부 약물에서는 정신적, 신체적 의존성이 있는 것으로 알려져 있다.

[0011] 따라서, 인위적인 방법으로 합성된 치료제의 형태가 아닌 종래에 우리가 섭취하고 있는 생약제 등을 식품의 형태로 공급할 수 있는 다이어트 조성물이 개발될 필요가 있다고 할 수 있다.

[0012] 한편, 감국은 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 차로 음용해 왔고, 한방에서는 그 꽃을 현기증, 해열, 염증, 고혈압 및 호흡계 질환에 사용해 왔다. 감국의 주성분으로는 플라보노이드 화합물, 테르페노이드 화합물, 페놀성 화합물 등이 알려져 있다. 감국의 생리활성 연구로는 항균활성, 항바이러스활성, 항산화활성, 면역조절활성 등이 있는 것으로 보고되고 있다. 상기와 같이 감국의 다양한 약리효과에 대해 알려져 있지만, 구체적으로 감국의 추출물 및 분획물이 어느 질병에 효과가 있는지에 대한 연구는 미진한 상태다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2009-0106700호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하고자, 본 발명은 비만 발현 인자인 PPAR-g 및 C/EBP pathway 단백질 발현량을 감소시키고, 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제하는 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0015] 또한 본 발명은 혈중 렙틴(leptin) 발현량을 감소시키고 아디포넥틴(adiponectin) 발현량을 증가시켜 우수한 항비만 효능 뿐 아니라 간 지질 침착 감소 효능을 가지는 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 감국 추출물 또는 분획물은 (a)감국을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매 중 선택된 어느 하나 이상의 용매로 추출하여 감국 추출물을 얻는 단계 및 (b)상기 감국 추출물에 증류수를 가하고 유기용매를 이용하여 순차적으로 분획하여 각 용매 분획물을 얻는 단계로 제조될 수 있다.

[0018] 특히, 상기 (a)단계의 탄소수 1 내지 4의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올 및 부탄올 중 선택된 어느 하나 이상인 것이 바람직하며, 상기 (b)단계의 유기용매는 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 물 중 선택된 어느 하나 이상인 것이 바람직하다.

[0019] 상기 감국 추출물 또는 분획물은 이소클로로제닉산(isochlorogenic acid), 다이하이드로시린진(dihydrosyringin), 시린진(syringin), 벤질-β-D-글루코피라노사이드(benzyl-β-D-glucopyranoside, 퀘세틴(quercetin), 메틸-3,4-디-O-카페오일 퀴네이트(methyl 3,4-di-O-caffeoyl-quinic acid) 및 시나린(cynarine) 중 선택된 어느 하나 이상을 수 있다.

[0020] 상기 감국 추출물 또는 분획물은 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것이 바람직하다.

[0021] 상기 감국 추출물 또는 분획물은 비만 발현 인자인 PPAR-g 및 C/EBP pathway 단백질 발현량을 감소시키며, 지방 전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제하고, 혈중 렙틴(leptin)의 발현량을 감소시키고, 아디포넥틴(adiponectin)의 발현량을 증가시킬 수 있다.

[0022] 또한 본 발명은 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 바, 상기 식품 조성물은 건강기능식품, 식품첨가제 또는 식이보조제일 수 있다.

[0023] 상기 감국 추출물 또는 분획물은 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따르면 비만 발현 인자인 PPAR-g 및 C/EBP pathway 단백질 발현량을 감소시키고, 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제할 수 있으며, 혈중 렙틴(leptin) 발현량을 감소시키고 아디포넥틴(adiponectin) 발현량의 증가를 통해 우수한 항비만 효능 뿐 아니라 간 지질 침착 감소 효능을 나타내어 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따라 감국 추출물, 분획물 및 7종의 단일 분획물의 분리방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 감국 추출물, 분획물 및 7종의 단일 분획물이 세포생존력에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 감국 추출물, 분획물 및 7종의 단일 분획물 처리 시 3T3-L1 지방전구세포에서의 지방축적율을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 감국 추출물 처리 시 C57BL/6 마우스에서의 렙틴, 아디포넥틴 함량을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따라 감국 에틸아세테이트 분획물 처리 시 C57BL/6 마우스에서의 렙틴, 아디포넥틴 함량을 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따라 감국 추출물 처리 시 C57BL/6 마우스의 간에서 PPAR-gamma 및 C/EBPs의 발현량을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 따라 감국 에틸아세테이트 분획물 처리 시 C57BL/6 마우스의 간에서 PPAR-gamma 및 C/EBPs의 발현량을 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따라 감국 추출물 처리 시 C57BL/6 마우스의 백색 부고환 지방 조직에서 PPAR-gamma 및 C/EBPs의 발현량을 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일실시예에 따라 감국 에틸아세테이트 분획물 처리 시 C57BL/6 마우스의 백색 부고환 지방 조직에서 PPAR-gamma 및 C/EBPs의 발현량을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

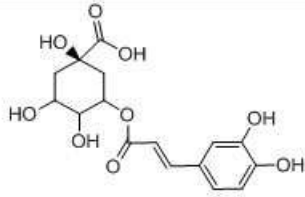
[0027] 본 발명은 감국 추출물 또는 분획물이 지방전구세포에서 지방세포로 활성화되는 과정에서 지방 전구세포에서 지질 축적을 억제하고, 지방세포 분화 과정에서 C/EBP-alpha, C/EBP-beta 및 C/EBP-gamma 및 PPAR-gamma와 같은 지방세포 분화의 초,중기 전사인자들의 단백질 발현을 유의적으로 감소시킴을 확인하였다.

[0028] 따라서 본 발명자들은 새로운 약물을 개발하기 위해 감국 추출물 또는 분획물에 대한 연구를 수행하여, 감국 추출물 또는 분획물이 고지방 식이로 유도된 비만에서의 우수한 효과가 있음을 확인하였고, 이를 토대로 본 발명을 완성하였다.

[0029] 이러한 본 발명의 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함한다.

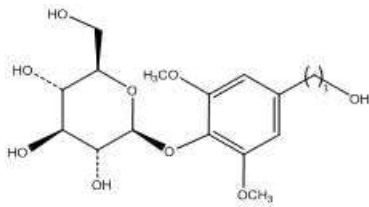
- [0030] 상기 감국(*Chrysanthemum indicum* L.) 추출물 또는 분획물은 감국의 다양한 부위로부터 추출될 수 있으며, 바람직하게는 감국의 꽃, 잎, 줄기, 뿌리 또는 전초로부터 추출되는 것이며, 더욱 바람직하게는 감국의 꽃 또는 잎으로부터 추출되는 것이며, 가장 바람직하게는 감국의 꽃으로부터 추출되는 것이다.
- [0031] 상기 감국 추출물 또는 분획물은 당업계에 공지된 추출, 분리 및 분획하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출, 분리 및 분획하여 수득한 것을 사용할 수 있다. 본 발명에서 정의된 '추출물'은 적절한 용매를 이용하여 감국으로부터 추출 처리에 의해 얻어지는 것이며, 예를 들어 감국의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.
- [0032] 상기 감국 추출물은 다양한 추출용매와 추출방법에 따라 추출될 수 있으며, 감국으로부터 추출물 또는 분획물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 상기 용매로는 물, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등의 탄소수 1 내지 4의 알코올 등을 단독으로 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다. 특히, 상기 용매로는 메탄올 또는 에탄올(주정)을 사용하는 것이 바람직하며, 특히 에탄올(주정)을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0033] 상기 추출 온도는 50~100℃인 것이 바람직하다. 또한 추출방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법이 사용될 수 있으며, 특히 열수추출법 또는 환류냉각추출법을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0034] 또한 상기 감국 분획물은 전술한 바와 같이 추출된 감국 추출물을 유기용매를 비극성에서 극성으로 분획하여 각 용매 분획물을 얻을 수 있다.
- [0035] 상기 감국 분획물을 분획하기 위한 적절한 용매로는 물, 에탄올, 메탄올, 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 또는 이들의 혼합용매일 수 있으며, 특히 물을 가하고, 디클로로메탄 및 에틸아세테이트를 이용하여 순차적으로 분획하여 얻어지는 분획물인 것이 좋다. 특히, 물 분획물과 에틸아세테이트 분획물의 경우 다른 분획물에 비해 항비만 활성이 현저히 뛰어나기 때문에 본 발명의 감국 분획물은 물 분획물, 에틸아세테이트 분획물 또는 이들의 혼합물인 것이 더욱 바람직하다.
- [0036] 상기와 같이 물 또는 유기용매를 이용하여 추출물을 얻은 이후에는 당업계에서 알려진 통상의 방법으로 상온에서 냉침, 가열 및 여과하여 액상물을 얻을 수 있으며, 또는 추가로 용매를 증발, 분무건조 또는 동결건조할 수도 있다.
- [0037] 또한 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 감국 추출물 또는 분획물은 전술한 바와 같이 추출 및 분획된 추출물이나 분획물을 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수도 있다. 또한 상기 추출물 또는 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획으로도 얻을 수 있다.
- [0038] 따라서 본 발명에서 사용되는 감국 추출물 및 분획물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출물, 분획물 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0039] 상기와 같이 추출 또는 분획한 본 발명의 감국 추출물 또는 분획물은 고지방 식이로 유도된 마우스 모델에서 우수한 항비만 효과를 가지며, 3T3-L1 지방 전구 세포에서 IBMX, 인슐린(insulin) 및 덱사메타손(dexamethasone)을 이용하여 분화를 유도하였을 때 지질 축적 억제를 하여 우수한 항비만 효과를 가진다. 특히, 본 발명의 유효성분인 7개의 단일성분의 경우 더욱 우수한 항비만 효과를 가진다.
- [0040] 상기 7개의 단일성분은 이소클로로제닉산(isochlorogenic acid, 하기 화학식 1), 다이하이드로시린진(dihydrosyringin, 하기 화학식 2), 시린진(syringin, 하기 화학식 3), 벤질-β-D-글루코피라노사이드(benzyl-β-D-glucopyranoside, 하기 화학식 4), 퀘세틴(quercetin, 하기 화학식 5), 메틸-3,4-디-O-카페오일 퀴네이트(methyl 3,4-di-O-caffeoyl-quinic acid, 하기 화학식 6) 및 시나린(cynarin, 하기 화학식 7)로 표시되는 화합물이다.

[0041] [화학식 1]



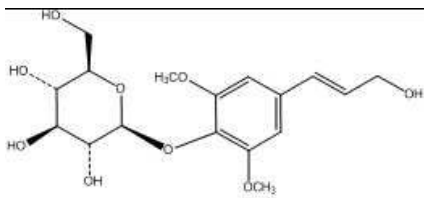
[0042]

[0043] [화학식 2]



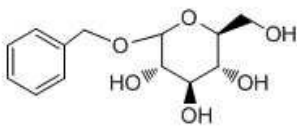
[0044]

[0045] [화학식 3]



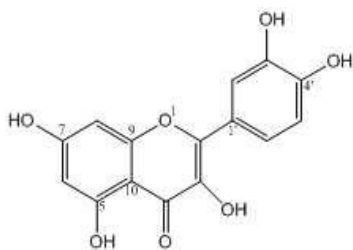
[0046]

[0047] [화학식 4]



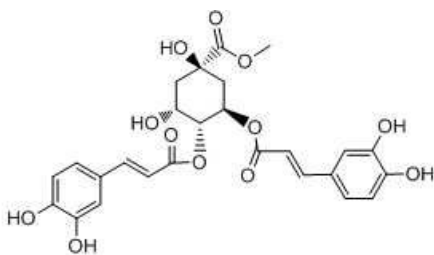
[0048]

[0049] [화학식 5]



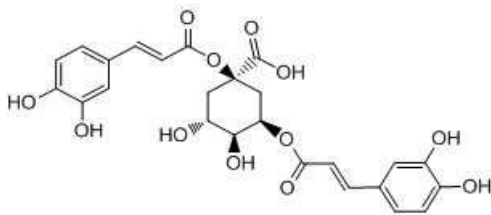
[0050]

[0051] [화학식 6]



[0052]

[0053] [화학식 7]



[0054]

[0055] 본 발명에서는 상기와 같이 추출 또는 분획한 본 발명의 감국 추출물 또는 분획물, 특히 전술한 7종의 감국 추출물 또는 분획물을 이용하여 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로의 분화를 억제함을 세포질 내의 중성지방을 확인하여 밝혀내었다. 또한 본 발명의 감국 추출물 또는 분획물이 지방세포 분화 과정에서 C/EBP- α , C/EBP- β , C/EBP- γ 및 PPAR- γ 와 같은 지방세포 분화의 초,중기 전사인자들의 단백질 발현을 유의적으로 감소시키고, 혈중 렙틴(leptin) 발현량을 감소, 아디포넥틴(adiponectin) 발현량의 증가시킴을 확인하였다.

[0056]

또한 본 발명에서는 실험동물모델을 이용하여 정상식이를 섭취하는 대조군 및 고지방 식이와 동시에 감국 추출물 및 분획물을 섭취한 실험군의 체중 및 체중증가량 변화를 측정하여 체중 및 체중 증가량에 미치는 영향을 확인하였으며, 그 결과 본 발명의 유효성분인 감국의 추출물 또는 분획물이 체중 및 체중 증가율을 유의성 있게 감소시킴을 확인하였다.

[0057]

따라서 본 발명의 감국 추출물 또는 분획물은 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방, 치료 및 개선에 유용한 약품 또는 식품으로 이용될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 인간 뿐 아니라 다른 동물의 비만이나 비만 관련 질환, 비만으로 인한 합병증의 예방, 치료 및 개선을 위해 사용될 수 있음은 물론이다.

[0058]

본 발명의 조성물은 신체 각 부위의 비만 또는 복부비만의 예방, 개선 또는 치료를 위하여도 사용될 수 있으며, 대상 복부비만으로는 장시간 의자에 앉아있는 생활을 하거나, 운동부족, 술(알코올) 섭취, 스트레스 등에 의한 복부비만을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059]

또한 비만으로 인한 합병증으로는 중성지방, 콜레스테롤, 저밀도 지질의 혈중농도 상승에 기인한 질병을 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 비만으로 인한 합병증으로는 대사증후군(내장 지방 증후군, 대사 이상 증후군 등), 고트리글리세라이드 혈증, 저HDL혈증, 협심증, 심근경색, 성기능부전증, 수면무호흡증, 월경전 증후군, 스트레스성 뇨실금을 포함하는 뇨실금, 과행동장애, 만성 피로 증후군, 골관절염, 체중 증가와 관련된 암, 기립성 저혈압, 폐고혈압, 월경장애, 당뇨병, 고혈압, 손상된 내당력, 관상동맥혈전증, 졸증, 우울증, 불안증, 정신병, 지연성 운동장애, 약물중독, 약물 남용, 인지장애, 알츠하이머병, 뇌허혈, 강박성 행동, 공황발작, 사회공포증, 대식증, 아테롬성동맥경화증, 담석증과 같은 담낭 질병, 식욕부진, 다낭성 난소 질환과 같은 생식 장애, 감염, 정맥류성 정맥, 표피증식 및 습진과 같은 피부병, 인슐린 저항성, 만성 동맥폐색증, 정형외과적 상해, 혈전색전증, 심장질환, 비뇨기질환, 지질증후군, 과혈당증, 스트레스 등이 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060]

이에 본 발명을 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0061]

상기 감국 추출물 또는 분획물은 약학 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1~80중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 복용 효율성이 떨어질 수 있으며, 95중량%를 초과할 경우에는 제형화의 어려움이 있을 수 있다.

[0062]

본 발명의 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형

제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당 되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 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, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0064] 본 발명은 약학 조성물은 연구자, 의사, 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적인 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학 조성물은 1~10,000mg/kg/day, 바람직하게는 1~200mg/kg/day의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다.

[0065] 본 발명의 약학 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0066] 또한 본 발명의 조성물은 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 또는 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0067] 또한 본 발명은 감국 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 포함하는 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 감국 추출물 또는 분획물이 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 감국 추출물 또는 분획물을 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0068] 또한 상기 유효성분인 감국 추출물 또는 분획물의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 변경될 수 있음은 물론이며, 상기 감국 추출물 또는 분획물은 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1~80중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 복용 효용성이 떨어질 수 있으며, 95중량%를 초과할 경우에는 제형화의 어려움이 있을 수 있다.

[0069] 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 감국 추출물 또는 분획물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가되는 것이다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하여 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 양으로 첨가될 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0070] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 감국 추출물 또는 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0071] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린 등의 천연 감미제나 사카린, 아스파르트름 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~10중량%, 바람직하게는 0.01~0.1중량%로 포함되는 것이다.

- [0072] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 좋다.
- [0073] 이하에서는 실시예를 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세하게 설명할 것이나. 이들 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것으로 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0074] 실시예 1. 감국 추출물 제조
- [0075] 공기중에서 건조한 감국(*Chrysanthemum indicum flowers*. CI) 식물체 3.0kg을 환류추출장치를 이용하여 70% 에탄올로 3회 반복 추출하여 감국 추출물 500g(수율 16.67%)을 얻었다.
- [0076] 실시예 2. 감국 분획물 제조
- [0077] 상기 실시예 1에서 얻은 감국 추출물 500g을 물에 녹인 다음, 디클로로메탄(dichloromethan, CH_2Cl_2)층을 분리하는 과정을 3회 반복하였다. 이렇게 얻어진 디클로로메탄 층을 합하여 감압 농축하여 분말형태의 감국 디클로로메탄 분획물 200g(수율 40%)을 얻었다. 남은 물층에 에틸아세테이트(ethyl acetate, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$)를 가하여 위와 동일한 방법으로 분획하였으며, 감압 농축 후 동결건조하여 분말형태의 감국 에틸아세테이트 분획물 110g(수율 22%)과 물 분획물 190g(수율 38%)을 얻었다.
- [0078] 실시예 3. 7종의 단일 분획물 분리
- [0079] 도 1에 도시한 바와 같이 상기 실시예 2에서 얻어진 에틸아세테이트 분획물과 물 분획물에서 총 32개의 감국 분획 단일 분획물을 얻었고, 그 중 비만에 효과가 있는 것으로 사료되는 7종의 단일 분획물을 분리하였다.
- [0080] 에틸아세테이트 분획물을 이용하여 다음과 같이 3종의 단일 분획물을 분리하였다.
- [0081] 먼저, 퀘세틴을 분리하기 위하여 실리카 겔 상에서 에틸아세테이트 분획을 컬럼을 이용하여 디클로로메탄과 메탄올 혼합용매를 사용하여 용해 분리하고, 분획은 TLC로 조정하였으며, 메탄올 용매를 증가시키면서 8개의 분획을 얻었다. 그 후, C.4번 분획에서 실리카겔 컬럼을 이용하여 메탄올과 물 혼합용매를 사용하여 퀘세틴(quercetin), 메틸 3,5-디-O-카페오일 퀴네이트(methyl 3,5-di-O-caffeoyl quinate)를 분리하였다.
- [0082] 그 후, C.5번 분획에서 실리카겔 컬럼을 이용하여 상기와 동일한 분획 과정을 거쳐 1,3-디카베오일퀴닌산(1,3-dicaffeoylquinic acid), 트리신(tricin), 이소람네티 3-O-β-D-글루코피라노사이드(isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside) 및 아피게닌-7-O-β-D-글루코피라노사이드(apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside)을 분리하였다.
- [0083] 그 후, C.7번 분획에서 실리카겔 컬럼을 이용하여 상기와 동일한 분획 과정을 거쳐 메틸 3,4-디-O-카페오일 퀴네이트(methyl 3,4-di-O-caffeoyl-quininate), 루테오린-7-O-β-D-글루코피라노사이드(luteolin-7-O-β-D-glucopyranoside), 아세틴-7-O-β-D-글루코피라노사이드(acetin-7-O-β-D-glucopyranoside) 및 리나린(Linarin)을 분리하였다.
- [0084] 그 다음, 물 분획물을 이용하여 다음과 같이 4종의 단일 분획물을 분리하였다.
- [0085] 물 분획물을 컬럼을 이용하여 메탄올과 물 혼합용매를 사용하여 용해 분리 하였고, 분획은 TLC로 조정하였으며, 메탄올 용매를 증가하면서 3개의 분획을 얻었다.
- [0086] 그 후, D.1번 분획에서 실리카겔 컬럼을 이용하여 클로로포름과 메탄올 혼합용매를 사용하여 클로로제닌산(chlorogenic acid), 티미딘(Thymidine), 디하이드로시린진(dihydrosyringin) 및 아데노산(adenosine)을 분리하였다.
- [0087] 그 후, D.2번 분획에서 실리카겔 컬럼을 이용하여 클로로포름과 메탄올 혼합용매를 사용하여 β-페닐에토시-β-D-글루코피라노사이드(β-phenylethoxy-β-D-glucopyranoside), 벤질-β-D-글루코피라노사이드(benzyl-β-D-glucopyranoside), 크립토크로로제닌산 메틸 에스터(cryptochlorogenic acid methyl ester) 및 클로로제닌산 메틸 에스터(chlorogenic acid methyl ester)를 분리하였다.

- [0088] 실험예 1. 세포 생존력 측정
- [0089] 1-1. 3T3-L1 지방전구세포의 준비 및 배양
- [0090] 지방전구세포와 지방세포의 증식 억제능을 확인하기 위해, 3T3-L1 지방전구세포를 American Type Culture Collection(ATCC, USA)으로부터 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 세포는 지방 세포의 대사 과정 연구에 널리 이용되는 세포주로서, 상기 세포의 분화가 활발히 일어날수록 지방 세포 내의 지방 축적도 활발히 일어난다. 미국 세포주은행(ATCC)에서 받은 세포주는 10% 송아지 혈청(Bovine Calf Serum ; BCS), 1% 페니실린이 함유된 DMEM 배지로 5% CO₂와 37℃가 유지되는 배양기 내에서 배양하였다. 2회 이상의 계대배양을 거쳐 세포가 안정화되었을 때 실험에 사용하였다.
- [0091] 1-2. 세포 생존력 측정
- [0092] 상기 실시예 1 내지 3에서 얻어진 감국 추출물, 분획물 및 7종의 단일 분획물의 세포생존력을 분석하기 위하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 에세이를 사용하여 실험을 수행하였다. 상기 농도로 접종하고, 24시간 동안 배양기에 배양한 후, 배양배지를 바뀐 후 독성이 없는 감국 추출물 및 분획물의 적정 농도를 찾기 위해 감국 추출물 및 분획물은 4, 20, 100 μ g/ml 농도로 처리하고, 7종의 단일 분획물은 0.4, 2, 10 μ M으로 처리하여 37℃, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션 하였다. 이후 MTT 완충액을 사용하여 측정하였다. 이 실험 과정은 기주시료 및 샘플을 세 세트로 실험하였다. 세포생존율을 하기 수학적 식 1로 계산하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0093] [수학적 식 1]
- [0094] 세포 생존율(%) = (시료처리군의 흡광도 / 대조군의 흡광도) x 100
- [0095] 실험결과 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 유효성분인 감국 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물은 고농도에서 독성이 없음을 확인하였다. 또한 단일성분도 고농도에서 독성이 없음을 확인하였다.
- [0096] 실험예 2. 지방 세포로의 분화 억제 확인
- [0097] 2-1. 지방세포 분화 확인
- [0098] 안정화된 3T3-L1 지방전구세포는 2×10^5 cell/well의 밀도로 48well plate에 분주하고 배양하여 100% confluent 시점이 되면 2일 동안 더 유지시켰다. 지방전구세포는 MDI(0.5mM 3-이소부틸-1-메틸잔틴(IBMx), 1 μ M 텍타메타손, 1 μ g/mL 인슐린)를 포함하는 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 1% 페니실린을 함유하는 DMEM 배지로 지방세포 분화를 2일 동안 유도하였고, 배양 48시간 후 1 μ g/mL 인슐린이 포함된 10% FBS, 1% 페니실린 함유 DMEM 배지로 2일 동안 배양하였다. 그 후, 6일 동안 2일마다 10% FBS, 1% 페니실린 함유 배지를 교체하여 배양하였다. 지방세포 분화 과정 동안 감국 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물을 각 배양액에 각각 4, 20, 100 μ g/ml의 농도로 처리하였고, 7종이 단일 분획물은 0.4, 2, 10 μ M의 농도로 처리하였으며, 분화가 완성되는 시점인 10일째 지방세포 분화 정도를 관찰하였다.
- [0099] 2-2. Oil Red O 염색
- [0100] 감국 추출물, 분획물 및 7종의 단일 분획물의 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화 억제를 확인하기 위하여 지방적(Lipid droplet)에 특이적으로 반응하는 Oil Red O 염색을 진행하였다.
- [0101] 구체적으로, 상기 2-1과 같이 지방세포 분화를 유도한 세포에서 배지를 제거하고 10% 포르말린(formalin)을 1시간 동안 상온에서 처리하여 고정하였다. 이후 60% 이소프로판올로 세척하고, 각 well을 완전히 건조시켰다. Oil Red O 염색약(60% Oil Red O stock, 40% 멸균증류수)을 1시간 동안 처리한 뒤, 60% 이소프로판올로 2회, 멸균증류수 1회 세척하였다. 결합한 Oil Red O의 용출을 위해 100% 이소프로판올로 10분간 처리하였고, 그 용출액을 520nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0102] 지방 세포에서의 지방 축적율을 하기 수학적 식 2로 계산하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0103] [수학적 식 2]
- [0104] 지방 축적율 (%) = (시료처리군의 흡광도 / 대조군의 흡광도) x 100
- [0105] 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 유효성분인 감국 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물 처리에 의해 지방 세포내 지방 축적이 농도 의존적으로 억제된 것을 확인하였으며, 단일 성분 처리에 의해 지방세포 내

지방 축적이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다.

[0106] 따라서, 본 발명의 본 발명의 감국 추출물 및 감국 분획물, 특히 7종 단일 분획물이 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 효율적으로 억제하여 비만의 예방 또는 치료 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[0107] 실험예 3. C57BL/6 마우스에서의 항비만 활성

[0108] 3-1. 실험모델 구축

[0109] 비만의 실험적 모델을 구축하기 위하여 C57BL/6J 웅성 마우스(20~25g)로 5주령을 샘타코(오산, 한국)에서 구입하여 1주 동안 고형사료와 물을 자유롭게 섭취시키면서 일정한 습도($50 \pm 10\%$)와 일정한 온도($22 \pm 2^\circ\text{C}$) 및 12시간 주기로 명암이 조절되는 실험 환경에 1주간 적응시켰다. 1주일 동안 적응 기간을 거친 후, 12군으로 나눈 후 정상대조군(Normal), 비만 유발군(45% HFD), 감국 추출물 처리군(8, 40, 200mg/kg, CIEE+HFD), 감국 에틸아세테이트 분획물 처리군(2, 10, 50mg/kg, CIEA+HFD) 및 양성대조군으로 가르시니아 캄보지아 추출물(200mg/kg, GC+HFD)군으로 나누었다. 감국 추출물, 감국 분획물 및 가르시니아 캄보지아 추출물은 0.9% 식염수로 용해시킨 후, 45% 고지방 식이 섭취와 동시에 하루에 한번씩 경구투여를 6주간 실시하였으며, 정상대조군과 비만 유발군은 0.9% 살린을 경구투여하였다. 비만 유발군, 감국 추출물 처리군, 감국 에틸아세테이트 분획물 처리군 및 양성대조군은 45% 고지방 식이를 6주일간 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 정상대조군은 일반 식이를 자유롭게 섭취하였다.

[0110] 3-2. 체중 및 식이섭취량의 변화

[0111] 본 발명의 감국 추출물 및 분획물의 항비만 효과를 확인하기 위하여, 체중 및 식이섭취량은 시험 개시일과 개시 후 주 1회 간격으로 측정하여 그 결과를 하기 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1

	Normal	HFD	CIEE + HFD			GC + HFD
			8 mg/kg	40 mg/kg	200 mg/kg	
Initial body weight (g)	21.68 $\pm$ 1.10	22.32 $\pm$ 1.16	21.14 $\pm$ 0.86	22.07 $\pm$ 1.30	21.96 $\pm$ 1.07	21.43 $\pm$ 0.97
Final body weight (g)	26.97 $\pm$ 1.75	36.73 $\pm$ 3.89	32.33 $\pm$ 2.48	31.47 $\pm$ 1.84	30.11 $\pm$ 2.08	28.53 $\pm$ 1.61
Body weight gain (g)	5.29 $\pm$ 1.65	14.41 $\pm$ 3.64	11.20 $\pm$ 2.29 *	9.40 $\pm$ 1.68 *	8.15 $\pm$ 1.93 **	7.10 $\pm$ 1.53 **

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

[0112]

표 2

	Normal	HFD	CIEA + HFD			GC + HFD
			2 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg	
Initial body weight (g)	21.68 $\pm$ 1.10	22.32 $\pm$ 1.16	21.81 $\pm$ 1.65	21.47 $\pm$ 0.59	21.73 $\pm$ 1.13	21.43 $\pm$ 0.97
Final body weight (g)	26.97 $\pm$ 1.75	36.73 $\pm$ 3.89	30.84 $\pm$ 1.72	30.23 $\pm$ 2.37	26.91 $\pm$ 2.10	28.53 $\pm$ 1.61
Body weight gain (g)	5.29 $\pm$ 1.65	14.41 $\pm$ 3.64	9.03 $\pm$ 1.64 **	8.76 $\pm$ 2.19 **	5.18 $\pm$ 1.99 **	7.10 $\pm$ 1.53 **

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

[0113]

[0114] 상기 표 1 및 표 2에 나타내내 바와 같이, 정상식이군에 비해 고지방 식이군이 유의적으로 체중이 증가하였으며, 이에 반해 가르시니아 캄보지아 추출물군은 고지방식이군에 비해 체중이 50.73% 감소하였다.

[0115] 표 1에 나타난 바와 같이 감국 추출물 처리군은 고지방 식이군에 비해 체중이 각각 22.28, 34.77 및 43.44% 감소하였고, 표 2에 나타난 바와 같이 감국 에틸아세테이트 분획물 처리군은 고지방 식이군에 비해 체중이 각각 37.34, 39.21 및 64.05% 감소함을 확인할 수 있었다.

[0116] 따라서, 본 발명의 유효성분인 감국 추출물 및 분획물은 실험동물의 체중을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰으며, 특히 감국 에틸아세테이트 분획물 50mg/kg에서 대조군인 가르시니아 캄보지아 군보다 체중 감소가 현저히 크게 나타났으며, 이러한 결과로부터 본 발명의 유효성분인 감국 추출물 및 분획물은 항비만 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[0117] 3-3. 장기중량 및 지방조직 무게 측정

[0118] 본 발명의 감국 추출물 및 분획물의 항비만 효과를 확인하기 위하여, 상기 3-1에서 준비한 실험 동물의 간 조직, 신장 조직 및 백색 부고환 지방 조직의 무게를 측정하였다. 구체적으로, 상기 3-1에서의 실험기간 종료 후, 실험동물을 에테르 마취하여 희생시킨 후, 복부를 절개하고, 각 조직을 적출하여 생리 식염수를 이용해 혈액 및 이물질을 제거하고 무게를 측정하였다. 그 결과는 하기 표 3 및 표 4에 나타내었다.

표 3

	Normal	HFD	CIEE (mg/kg)		
			8	40	200
White adipose tissue (WAT) (g)	0.383±0.162	2.001 ± 0.252	1.479 ± 0.300 *	1.278 ± 0.367 **	1.024 ± 0.250 **
Liver (g)	1.244 ± 0.147	1.356 ± 0.184	1.256 ± 0.142	1.286 ± 0.222	1.335 ± 0.287
Spleen (g)	0.068 ± 0.014	0.087 ± 0.029	0.080 ± 0.026	0.090 ± 0.019	0.086 ± 0.023
Kidney(g)	0.269 ± 0.088	0.331 ± 0.051	0.312 ± 0.021	0.313 ± 0.025	0.327 ± 0.015
Fat/body weight ratio (mg/g)	13.89 ± 5.56	54.56 ± 9.02	46.95 ± 9.02	40.49 ± 11.46 *	34.06 ± 8.19 **

[0119]

표 4

	Normal	HFD	CIEA (mg/kg)		
			2	10	50
White adipose tissue (WAT) (g)	0.383±0.162	2.001 ± 0.252	1.313 ± 0.250 **	1.054±0.457 **	0.592 ± 0.174 **
Liver (g)	1.244 ± 0.147	1.356 ± 0.184	1.369 ± 0.159	1.172 ± 0.164	1.181 ± 0.236
Spleen (g)	0.068 ± 0.014	0.087 ± 0.029	0.093 ± 0.029	0.077 ± 0.010	0.088 ± 0.009
Kidney(g)	0.269 ± 0.088	0.331 ± 0.051	0.328 ± 0.027	0.316 ± 0.020	0.320 ± 0.074
Fat/body weight ratio (mg/g)	13.89 ± 5.56	54.56 ± 9.02	42.16 ± 8.29 **	37.25 ± 11.08 **	22.09 ± 6.13 **

[0120]

[0121] 상기 표 3 및 표 4에 나타난 바와 같이, 백색 부고환 지방의 경우 정상대조군(Normal)에 비해 비만 유발군(HFD)이 유의적으로 무게가 증가한 반면, 가르시니아 캄보지아 추출물군(GC)은 유의적으로 무게가 감소함을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 유효성분인 감국 추출물 및 분획물 처리군에서는 백색 부고환 지방 조직의 무게가 농도 의존적으로 유의성있게 감소함을 확인할 수 있었다.

[0122] 따라서, 본 발명의 감국 추출물 및 분획물은 항비만 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[0123] 3-4. 혈청 내 중성지방 농도의 측정

[0124] 본 발명의 감국 추출물의 항비만 효과를 확인하기 위하여, 실험 종료 후 실험동물의 혈액 내 중성지방의 농도를 측정하였다.

[0125] 구체적으로, 혈액은 실험이 종결된 후 절식, 마취 후 심장 채혈하였으며, 채취한 혈액은 상온에서 30분간 방치한 후 4℃에서 3000rpm으로 10분간 원심분리하여, 혈청(serum)을 얻어 중성지방(triglyceride), 총 콜레스테롤(total cholesterol), 고밀도 지단백질(high density lipoprotein) 및 저밀도 지단백질(low density lipoprotein) 농도를 아산제약(Asanpharm, Korea) kit를 이용하여 측정하였고, 그 결과를 하기 표 5 및 표 6에

나타태었다.

표 5

	Normal	HFD	CIEE (mg/kg)		
			8	40	200
Triglyceride (mg/dl)	126.016 ± 19.153	105.610 ± 12.778	87.421 ± 9.761	80.400 ± 6.272 *	108.393 ± 8.538
Total cholesterol (mg/dl)	125.457 ± 19.564	215.478 ± 18.888	207.422 ± 9.483	171.056 ± 12.953 *	199.056 ± 11.730
HDL-cholesterol (mg/dl)	53.753 ± 11.148	86.745 ± 8.898	62.568 ± 5.926 **	60.555 ± 4.861 **	93.375 ± 8.815
LDL-cholesterol (mg/dl)	46.501 ± 9.637	107.610 ± 16.237	106.484 ± 12.572	94.421 ± 12.040	84.002 ± 6.452 *

[0126]

표 6

	Normal	HFD	CIEA (mg/kg)		
			2	10	50
Triglyceride (mg/dl)	126.016 ± 19.153	105.610 ± 12.778	93.032 ± 16.107	94.016 ± 17.555	87.040 ± 15.332
Total cholesterol (mg/dl)	125.457 ± 19.564	215.478 ± 18.888	180.472 ± 16.252 *	172.754 ± 13.307 *	172.065 ± 13.259 **
HDL-cholesterol (mg/dl)	53.753 ± 11.148	86.745 ± 8.898	61.989 ± 7.770 **	86.568 ± 7.738	117.500 ± 8.285 **
LDL-cholesterol (mg/dl)	46.501 ± 9.637	107.610 ± 16.237	93.431 ± 8.231	63.695 ± 13.526 **	37.157 ± 7.364 **

[0127]

[0128] 상기 표 5 및 표 6에 나타난 바와 같이, 정상대조군(Normal)에 비해 비만 유발군(HFD)의 혈청 내 중성지방, 총 콜레스테롤 및 저밀도 지단백질의 농도가 높게 나타났으며, 고밀도 지단백질은 농도가 낮게 나타남을 확인할 수 있었다. 반면, 본 발명의 유효성분인 감국 추출물 및 분획물 처리군에서는 비만 유발군에 비해 혈청 내 중성지방, 총 콜레스테롤 및 저밀도 지단백질의 농도는 낮게 나타났으며, 고밀도 지단백질 농도는 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

[0129] 따라서, 본 발명의 감국 추출물 및 분획물은 실험동물의 중성 지방, 총콜레스테롤 및 저밀도 지단백질의 농도를 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시키고, 고밀도 지단백질의 농도를 농도 의존적으로 유의성 있게 증가시켜, 항비만 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[0130] 3-4. 혈청 내 렙틴 및 아디포넥틴 농도의 측정

[0131] 본 발명의 감국 추출물 및 분획물의 항비만 효과를 확인하기 위하여, 실험 종료 후 실험동물의 혈액 내 렙틴 및 아디포넥틴 농도를 측정하였다.

[0132] 상기 3-3에서와 같이 심장 채혈하여 채취한 혈액을 원심분리하여 혈청을 얻고, 렙틴(leptin) 및 아디포넥틴(adiponectin)을 측정하였다. 렙틴 및 아디포넥틴의 농도는 ELISA kit을 이용하여 측정하였고, 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0133] 도 4a에 나타난 바와 같이, 혈청 내 렙틴의 농도는 정상식이군에 비하여 고지방식이군에서 유의적으로 증가되었고, 대조구인 가르시니아 캄보지아 추출물군은 고지방식이군에 비해 유의적으로 감소하였다. 또한, 본 발명의 유효성분인 감국 추출물 투여군에서는 혈청 내 렙틴의 농도가 고지방식이군에 비해 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

- [0134] 도 4b에 나타낸 바와 같이, 혈청 내 아디포넥틴 농도는 정상식이군에 비하여 고지방식이군에서 유의적으로 감소되었고, 대조구인 가르시니아 캄보지아 추출물군은 고지방식이군에 비해 유의적으로 증가되었다. 또한, 본 발명의 유효성분인 감국 추출물 투여군에서는 혈청 내 아디포넥틴의 농도가 고지방식이군에 비해 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었다.
- [0135] 또한 도 5a에 나타낸 바와 같이, 혈청 내 렙틴의 농도는 정상식이군에 비하여 고지방식이군에서 유의적으로 증가되었고, 대조구인 가르시니아 캄보지아 추출물군은 고지방식이군에 비해 유의적으로 감소하였다. 또한, 본 발명의 유효성분인 감국 추출물 투여군에서는 혈청 내 렙틴의 농도가 고지방식이군에 비해 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.
- [0136] 도 5b에 나타낸 바와 같이, 혈청 내 아디포넥틴 농도는 정상식이군에 비하여 고지방식이군에서 유의적으로 감소되었고, 대조구인 가르시니아 캄보지아 추출물군은 고지방식이군에 비해 유의적으로 증가되었다. 또한, 본 발명의 유효성분인 감국 추출물 투여군에서는 혈청 내 아디포넥틴의 농도가 고지방식이군에 비해 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었다.
- [0137] 이같은 결과로부터, 본 발명의 항비만 효과가 우수함을 알 수 있었다.
- [0138] 실험예 4. 웨스턴 블롯
- [0139] 본 발명의 유효성분인 감국 추출물 및 분획물이 비만 관련 유전자를 억제하는지 확인하고자 웨스턴 블롯을 이용하여 PPAR-gamma, C/EBP alpha, C/EBP beta 및 C/EBP delta를 확인하였다.
- [0140] 먼저, 간 조직 및 백색 부고환 지방 조직에 용해 완충액을 넣어 균질화한 후, 원심분리기를 이용하여 상층액을 얻었다. 이를 12% SDS-폴리아크릴 아마이드겔에 로딩한 후 막에 블롯팅하였다. 막을 0.1% 트윈-20이 첨가된 1M 트리스 완충액(TBS, pH 7.2)으로 세척한 후, 5% 탈지유가 첨가된 TBS-T에서 2시간 동안 고정하였다. TBS-T로 세척한 후 항 PPAR-gamma, C/EBP alpha, C/EBP beta 및 C/EBP delta가 표지된 항체를 5% 탈지유가 첨가된 TBS-T에 1:2500의 비율로 희석하여 첨가하였다. 4℃에서 하룻밤 방치한 후, TBS-T로 세척하고 2차 항체를 1:2,000의 비율로 희석하여 1시간 동안 처리하였다. 이후, 단백질 밴드를 강화된 화학발광(enbanced chemiluminesence, ECL) 시스템을 사용하여 가시화하였다.
- [0141] 도 6 내지 9에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 감국 추출물 및 분획물은 농도의존적으로 간 및 백색 부고환 지방 조직에서 PAR-gamma, C/EBP alpha, C/EBP beta 및 C/EBP delta 단백질 발현을 농도의존적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 감국 추출물 및 분획물은 비만 인자들의 발현을 억제하여, 비만, 비만 관련 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료 효과가 우수할 것임을 예측할 수 있었다.
- [0142] 제제예 1. 약학 제제의 제조
- [0143] 산제 제조
- [0144] 감국 추출물 또는 분획물 20mg, 유당 100mg 및 탈트 10mg을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0145] 정제 제조
- [0146] 감국 추출물 또는 분획물 10mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0147] 캡슐제 제조
- [0148] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 감국 추출물 또는 분획물 10mg, 결정성 셀룰로오스 3mg, 락토오스 14.8mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.2mg을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0149] 주사제 제조
- [0150] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1앰플당(2mL) 감국 추출물 또는 분획물 10mg, 만니톨 180mg, 주사용 멸균 증류수 2,974mg 및 Na₂HPO₄ · 2H₂O 26mg으로 제조하였다.
- [0151] 액제 제조
- [0152] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 감국 추출물 또는 분획물 20mg, 이성화당 10g 및 만니톨 5g을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합하였다. 그 다음 정제수를 더 가하여 전체 100mL로 조절한 후 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[0153] 제제예 2. 식품 제제의 제조

[0154] 건강식품 제조

[0155] 감국 추출물 또는 분획물 100mg, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3mg, 제1인산칼슘 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼슘 90mg, 탄산칼슘 100mg 및 엽화마그네슘 24.8mg을 혼합한 다음, 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다. 이때, 상기 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

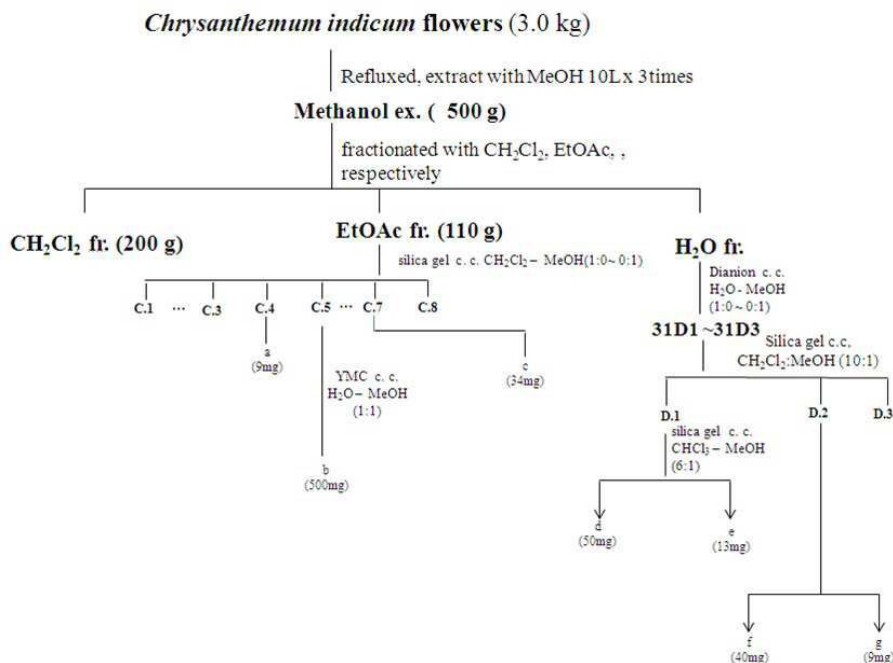
[0156] 건강음료 제조

[0157] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 감국 추출물 또는 분획물 100mg, 비타민 C 15g, 비타민 E(분말) 100g, 젖산철 19.75g, 산화아연 3.5g, 니코틴산아미드 3.5g, 비타민 A 0.2g, 비타민 B1 0.25g, 비타민 B2 0.3g 및 정량의 물을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하여 건강음료를 제조하였다. 이때, 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

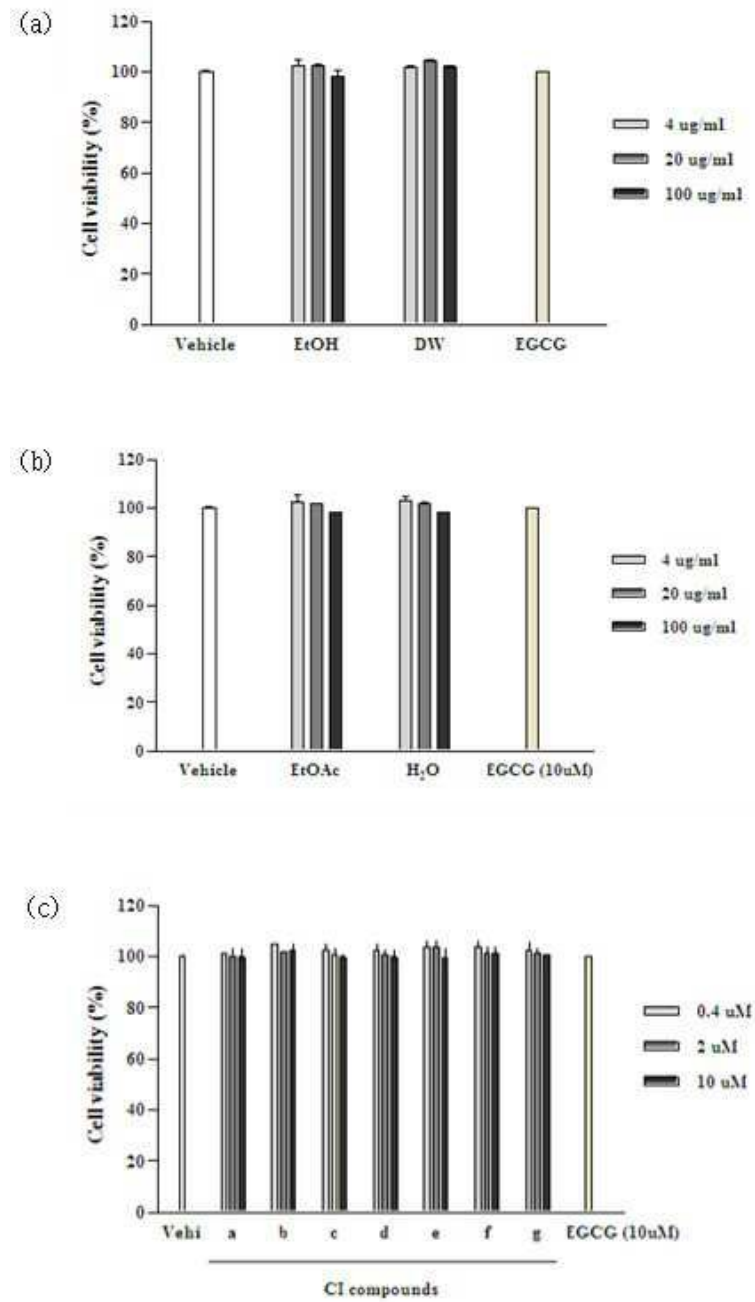
[0158] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

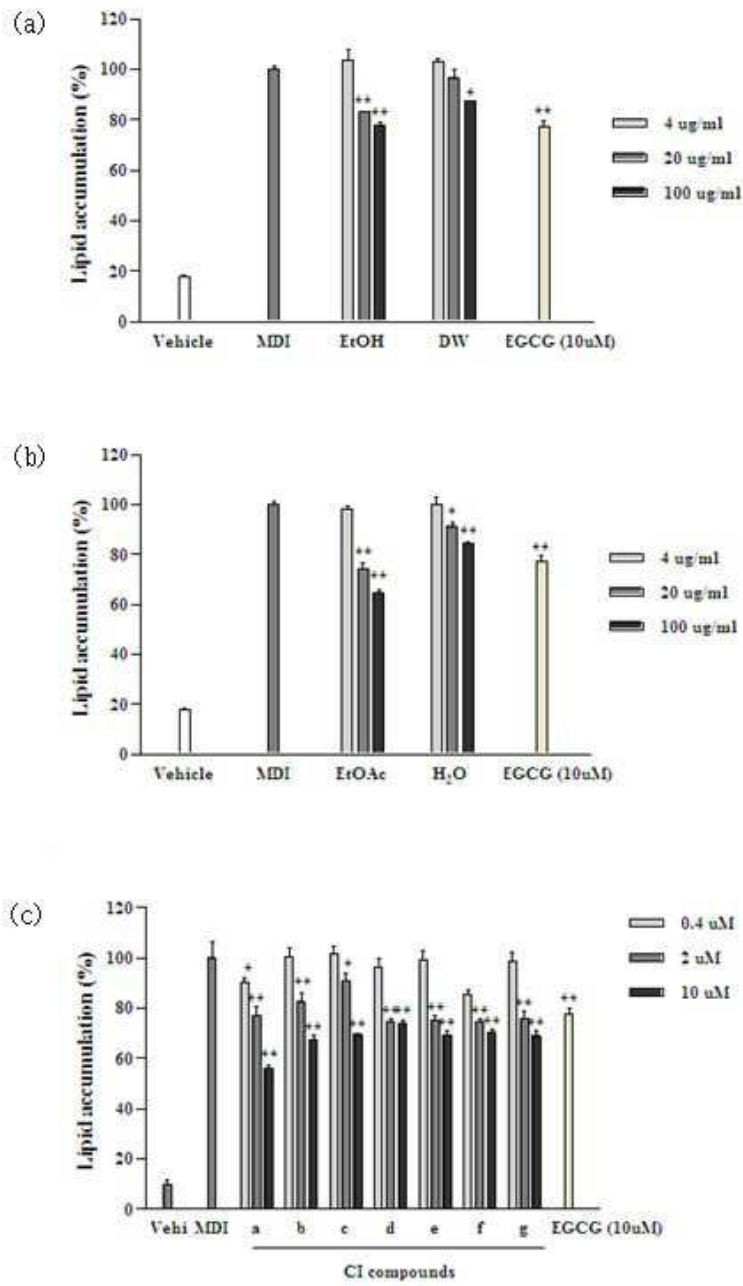
도면1



도면2

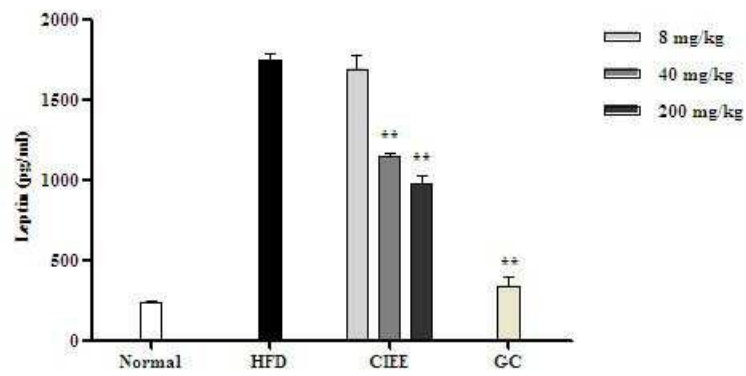


도면3

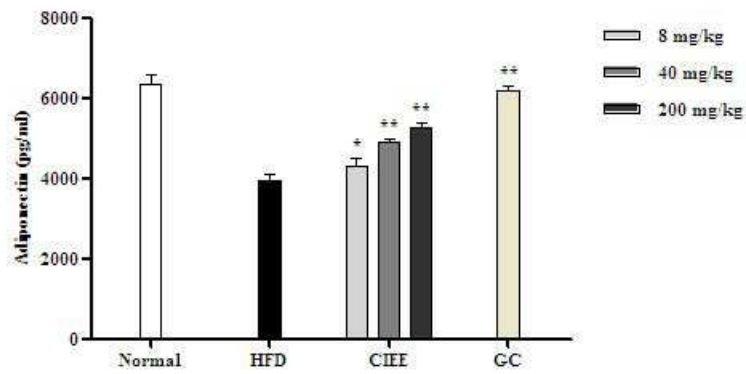


도면4

(a)

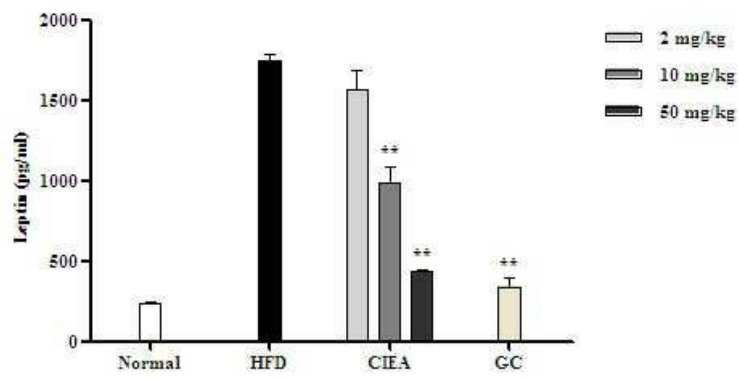


(b)

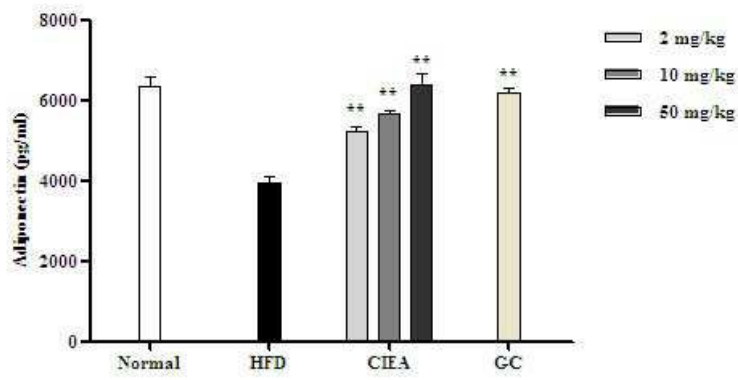


도면5

(a)

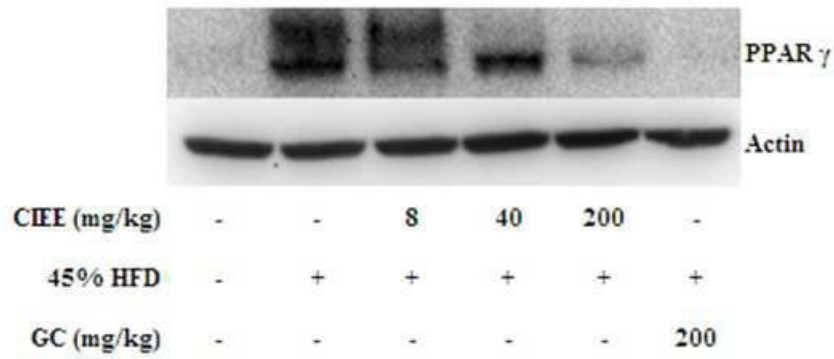


(b)

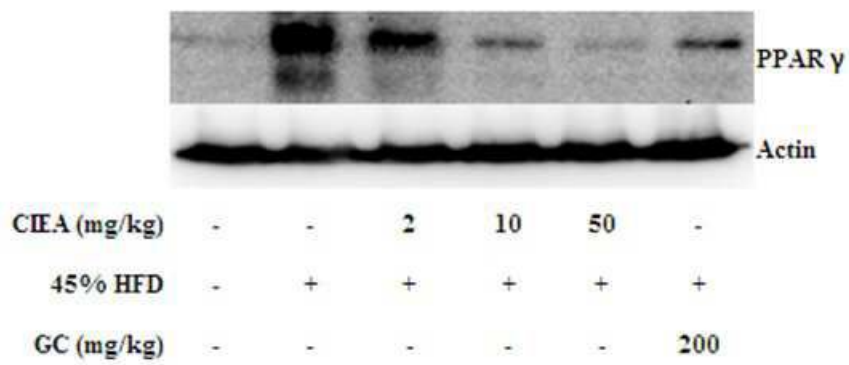


도면6

(a)

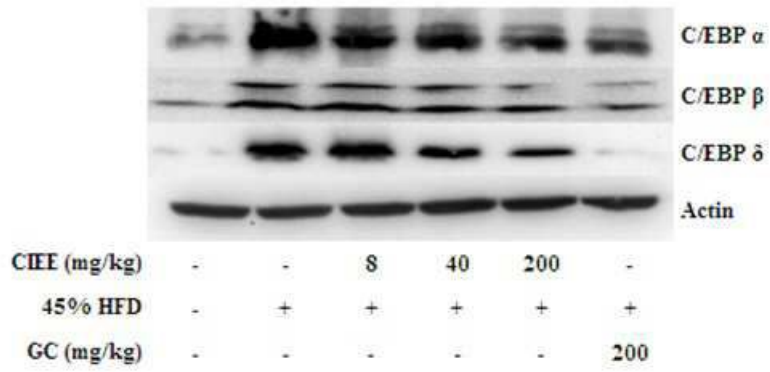


(b)

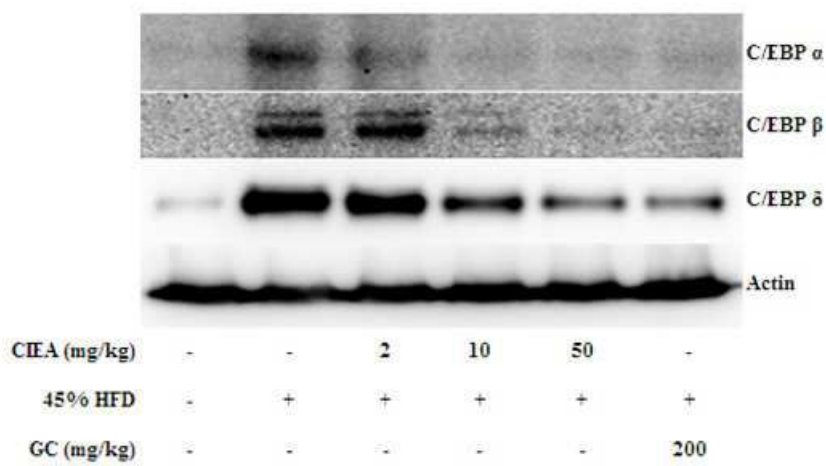


도면7

(a)

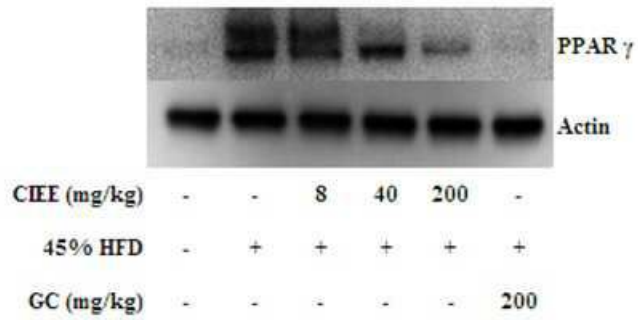


(b)

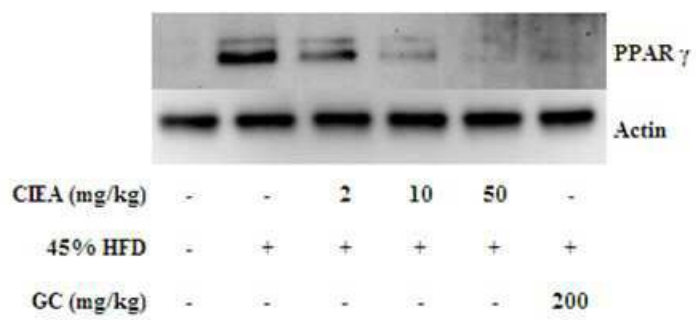


도면8

(a)

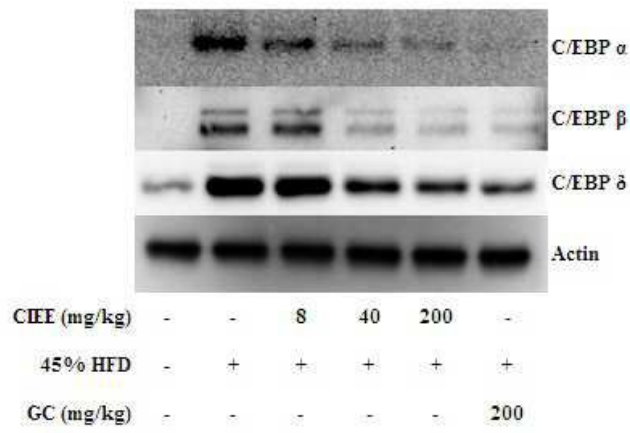


(b)



도면9

(a)



(b)

