



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0038068
(43) 공개일자 2012년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/346 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0099603

(22) 출원일자 2010년10월13일

심사청구일자 2010년10월13일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

정혜광

대전광역시 유성구 반석서로 98, 609동 1102호 (반석동, 반석마을6단지아파트)

정영철

경상남도 진주시 초장로14번길 27, 초전푸르지오아파트 101동 1702호 (초전동)

(74) 대리인

백경업

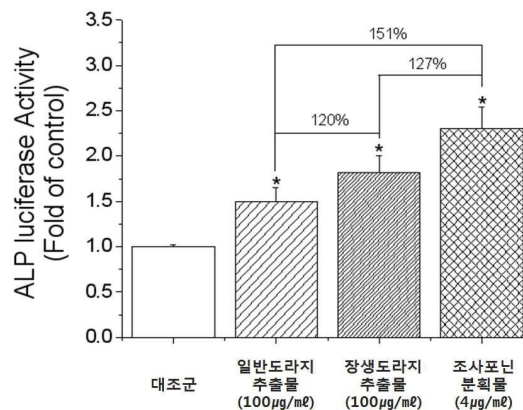
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물을 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 장생도라지 추출물 유래의 조사포닌 분획물을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로 상기 조사포닌 분획물은 조골세포의 분화를 촉진하는 효과가 있어 골다공증을 비롯한 골질환의 치료에 효과적이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A090923

부처명 보건복지가족부

연구사업명 보건의료 연구개발사업

연구과제명 길경과 갈근을 이용한 골 형성 촉진 및 골다공증 예방 기능성 식품 소재 개발

주관기관 충남대학교

연구기간 2009.05.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

장생도라지 유래의 조사포닌 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물은 장생도라지 열수 추출물을 이온교환수지 컬럼에 흡착시킨 다음 물로 당 성분을 제거한 후 흡착된 유기물을 메탄올로 용출시켜 얻은 조사포닌 정제 분획물인 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 조골세포의 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

장생도라지 유래의 조사포닌 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물은 장생도라지 열수 추출물을 이온교환수지 컬럼에 흡착시킨 다음 물로 당 성분을 제거한 후 흡착된 유기물을 메탄올로 용출시켜 얻은 조사포닌 정제 분획물인 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 건강기능식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스포, 이온음료를 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 본 발명은 장생도라지 추출물 유래의 조사포닌 분획물(crude saponin fraction)을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0003] 도라지(길경, *Platycodon grandiflorum* A. DC)는 배농, 거담, 기관지염, 천식 등의 호흡기계 질환에 사용되어온 생약제로서, 도라지가 배합되어 있는 한방 처방의 수가 동의보감에 273건, 방약합편에 49건에 이를 정도로 다양한 약리작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 도라지의 주요 약리성분은 테르펜계 사포닌이며, 이 약리성분은 동물실험을 통하여 진해, 거담작용, 중추신경억제작용(진정, 진통, 해열효과), 급만성 염증에 대한 항염증작용, 항궤양 및 위액분비 억제작용, 혈관을 확장하여 혈압을 낮추는 항콜린작용, 혈당강하작용, 콜레스테

를 대사 개선작용 등이 있는 것으로 밝혀져 있다(Meshi T, Sato Y., Chem. Pharm. Bull., 20, p.2079, 1972 ; Tada A, Kaneiwa Y, Shoji J, Shibata S., Chem. Pharm. Bull., 23, p.2965, 1975).

- [0004] 이외에도 도라지의 열수 및 에탄올 추출물은 곰팡이의 아프라톡신을 억제하며, 이눌린 분획은 식균작용과 고형암 및 복수암에 대한 강력한 항종양효능이 있고, 40% 도라지엑기스는 알코올흡수 억제작용이 있는 것으로 알려져 있다(Hitokoto H, Morozumi S, Wauke T, Sakai S, Ueno I., Mycopathologia, 66, p.161, 1979 ; Naga, T., Matsuda, H., Makata, K., Namba and Kubo, M., Shoyakugaku Zasshi, 40, p.378, 1986 ; Nagao, T., Matsuda, H., Nambo, K. and Kubo, M., Shoyakugaku Zasshi, 40, p.367, 1986 ; JP 소60-89427, 1985; JP 평3-264534 1991). 또한 도라지는 식품첨가제, 진정제, 성인병 등의 치료제로 전통적으로 사용되어 왔다(Lee, 1973).
- [0005] 장생도라지 추출물은 20년 이상의 도라지 뿌리를 열수추출한 추출물로 고콜레스테롤증(hypercholesterolemia), 고지혈증(hyperlipidemia), 간섬유증(hepatic fibrosis), 천식(bronchial asthma) 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 1995; Lee et al., 2004; Choi et al., 2009).
- [0006] 또한 상기 장생도라지 추출물은 대식세포의 증식 및 활성 증가, 식균작용, 암 세포의 증식 억제, 산화질소(nitric oxide)의 발생, IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 발현 등으로 인한 면역증가활성을 가진다(Choi et al., 2001a, b).
- [0007] 또한 상기 장생도라지 추출물에서 분리한 조사포닌 분획물은 명백한 항염증 효과와, 세포 내 ROS 생성, NF-kappaB 활성의 저해로 인한 과산화 라디칼을 제거할 수 있는 항산화 효과가 있고(Kim et al., 2006), ROS 신호 전달을 통한 NF-kappaB의 조절로 인해 암 세포의 전이를 억제하기도 하며(Lee et al., 2008), AMPK(AMP-dependent protein kinase)의 활성을 통해 알코올성 지방간 질환을 억제하기도 한다(Khanal et al., 2009a). 또한 에탄올 생체활성화를 막고 자유 라디칼을 제거하여 에탄올로 유도된 간독성을 보호하기도 하고(Khanal et al., 2009b), 염증성 사이토카인의 억제 및 항알레르기 효과도 있다(Han et al., 2009).
- [0008] 그러나 상기 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물이 이처럼 항염, 항산화, 항알레르기, 암전이 억제 등의 효과에 대해서는 알려져 있지만 뼈와 관계된 효과는 아직 보고되지 않았다.
- [0009] 본 발명에서는 상기 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물이 RUNX2(a member of the Runt family of transcription factors, Van Wijnen et al., 2004)의 발현을 증진시켜 골세포 생성에 영향을 주는 것을 확인하였으며, 이로 인해 본 발명의 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물이 골다공증을 비롯한 뼈 질환의 치료제로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0010] 뼈(骨)는 우리 몸에서 물리적 지지체로서, 몸의 형태와 관절을 유지하고, 중요한 장기를 외부의 충격으로부터 보호하며, 칼슘, 인의 저장소로서 이의 무기질이 몸에서 부족하거나 증가할 때 일정한 농도로 유지시켜주는 역할을 한다. 또한, 뼈도 다른 장기와 마찬가지로 신진대사가 활발하게 일어나는데, 신체가 성장할 때에는 뼈가 길어지고 굽어지며, 성장이 멈춘 후에는 노후된 뼈가 파골세포(破骨細胞)에 의해 제거되고, 뼈가 제거된 곳에서 조골세포(造骨細胞)에 의해 다시 새로운 뼈가 생성되는 반응이 일생동안 진행된다. 이와 같은 뼈의 제거, 뼈의 흡수, 흡수된 뼈의 재생(remodeling) 등의 균형의 신진대사에 의해 우리 몸의 뼈가 유지되는 것이다.
- [0011] 그러나, 파골세포와 조골세포의 형성 속도에 균형이 깨져서, 뼈의 재흡수가 뼈의 재생보다 빠르게 되면, 뼈의 증가보다 더 빠른 속도로 뼈 손실이 발생하여, 뼈의 크기가 감소하게 되는데, 이러한 뼈의 신진대사성 질환을 골다공증(osteoporosis)이라 한다.
- [0012] 흔히, 골다공증은 점차적으로 골 조직의 석회화 감소되면서, 골밀도가 낮아져 결국 골수강(骨髓腔)이 넓어지는 상태를 말하는데, 골수강이 넓어진 상태가 계속 진행되어, 뼈가 약해지면서 작은 충격에도 쉽게 골절(骨折)이 되는 증상이 나타나며, 요통, 건통, 등걸림, 관절통 및 무기력 증상이 나타난다. 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있다. 한편 개인차는 있지만 백인보다는 흑인이 골 재흡수 수준(bone resorption level)이 낮아 골량이 더 높으며, 대개 골량은 14~18세에 가장 높고 노후에는 1년에 약 1%씩 감소한다. 특히 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 에스트로젠 농도가 급속히 감소하는 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다.
- [0013] 이와 같이 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가되고 있다. 또한, 전세계적으로 골질환 치료와 관련되어 시장 규모가 점차 증가할 것으로 예상되기 때문에, 세계적인 각 연구 기

관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.

[0014] RUNX2는 뼈의 생성에 가장 중요한 골형성 마스터 유전자 중의 하나이다. RUNX2의 활성화는 다양한 외부 신호전달로 조절이 된다. 인산화작용, 아세틸화, 단백질 분해작용(ubiquitination) 등이 이에 대한 활성화와 안정성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Bae and Lee, 2006). RUNX2는 조골세포 분화 및 뼈의 생성에 가장 중요한 조절인자이며 RUNX2 유전자를 제거한 마우스(RUNX2 knockout mice)는 조골세포의 성숙과정이 지연되어, 막 내 및 연골의 골화 작용이 중단되는 것이 확인되었다(Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). 또한 RUNX2는 조골세포에 특이적인 ALP(alkaline phosphatase), OC(osteocalcin), OP(osteopontin), 1형 콜라겐(type I collagen) 등의 다양한 유전자의 발현을 조절한다(Banerjee et al., 1997; Ducky et al., 1997). 성숙한 조골세포에서 RUNX2의 발현이 억제(expression of a dominant negative RUNX2)되면 조골세포의 활성화저하로 뼈의 생성과 뼈의 밀도가 심각하게 줄어드는 것으로 확인되었다(Ducky et al., 1999). 인간 RUNX2 유전자의 돌연변이로는 쇄골두개골 형성이상(cleidocranial dysplasia, CCD), 빗장뼈(clavicle)의 결손, 개방형 숨구멍(open fontanelles), 여분의 치아생성(supernumerary teeth), 단신(short stature) 등으로 대표되는 상염색체우성질환(autosomal dominant disease) 등이 있다(Mundlos et al., 1997). RUNX2[+/-] 이형 접합체의 유전자를 가진 마우스(RUNX2[+/-] heterozygous mice)에서 전형적인 쇄골두개골 형성이상 증상인 빗장뼈의 발육부진(hypoplasia of the clavicle), 막 뼈(membranous bones) 발달의 지연 등이 보고되었으며(Ducky et al., 1997) 사람에게도 비슷한 양상이 나타나는 것이 확인되었다(Mundlos et al., 1997; Lee et al., 1997). RUNX2의 타겟유전자로는 전사인자(transcriptional factor)인 OC(osteocalcin), ALP(alkaline phosphatase), OSE(osteoblast specific element) 등이 있으며, 상기 유전자들도 RUNX2와 더불어 대표적인 조골세포분화 마커로 알려져 있다.

[0015] 본 발명자들은 장생도라지 추출물을 이용하여 연구를 진행하던 중, 장생도라지 추출물 유래의 조사포닌 분획물이 조골세포 분화를 유도하는 활성을 나타내어 부작용 없이 골다공증을 예방하고 치료하는데 상기 조사포닌 분획물이 효과적으로 사용될 수 있음을 밝힘으로 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 장생도라지 추출물 유래의 조사포닌 분획물을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 장생도라지 추출물 유래의 조사포닌 분획물을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 ‘조사포닌 분획물’은 장생도라지 추출물을 이온교환수지를 통과시켜 얻은 사포닌 성분이 다량 함유된 조사포닌 정제 분획물이다.

[0019] 본 발명의 장생도라지 추출물은 장생도라지를 수분의 함량이 5% 이하가 되도록 건조하고 이를 분쇄한 후, 추출용매로 물 또는 탄소수 1 내지 4의 저급알코올을 장생도라지 분말의 0.5 내지 30배로 사용하여 10 내지 100℃의 추출온도에서 0.5 내지 48시간 동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 가열추출 등의 추출방법으로 1 내지 7회 추출한 후 여과하고 동결 건조하여 수득할 수 있다.

[0020] 상기 추출용매는 바람직하게는 물 또는 에탄올을 사용하는 것이 좋으며 가장 바람직하게는 물을 사용하는 것이 좋다. 상기 추출용매의 증량은 가장 바람직하게는 장생도라지 분말의 5 내지 15배가 좋다. 또한 추출온도는 40 내지 95℃가 가장 바람직하며, 추출시간은 2 내지 10시간이 바람직하다. 추출방법은 열수추출법을 사용하는 것이 가장 바람직하며 추출 횟수는 1 내지 3회가 바람직하다.

[0021] 본 발명은 상기 제조방법으로부터 얻어진 장생도라지 추출물을 물에 녹여 여과한 여과액을 Amberlite XAD-2, Diaion MCI Gel HP20, 또는 Kogel BG4600과 같은 이온교환수지를 통과시켜, 당 성분을 제거한 후, 컬럼에 흡착되어 남은 유기물 성분을 다시 메탄올, 에탄올 등과 같은 저급알코올용액, 바람직하게는 메탄올 용액으로 탈착시켜, 물 및 저급 알콜 가용 분획물을 각각 제조한 후, 상기 저급알콜 가용분획물에 에틸에테르 등과 같은 비극성 용매를 가하여 침전된 침전물로부터 사포닌 성분이 다량 함유된 조사포닌 분획물을 제공한다.

[0022] 따라서, 본 발명은 장생도라지를 건조, 분쇄한 후, 물 또는 에탄올을 추출용매로 하여 열수추출법으로 추출한 후 수득한 장생도라지 조추출물을 물에 녹여 여과한 여과액을 HP-20(diaion) 컬럼과 같은 이온교환수지를 통과

시켜, 당 성분을 제거한 후, 컬럼에 흡착되어 남은 유기물 성분을 다시 메탄올, 에탄올 등과 같은 저급알콜용액, 바람직하게는 메탄올 용액으로 탈착시켜, 물 및 저급 알콜 가용 분획물을 각각 제조한 후, 상기 저급알콜 가용 분획물에 에틸에테르 등과 같은 비극성 용매를 가하여 침전된 침전물로부터 사포닌 성분이 다량 함유된 조사포닌 분획물을 얻는다.

[0023] 본 발명의 조사포닌 분획물에는 디아피오플라티코사이드 E(deapioplatycoside E), 플라티코사이드 E(platycoside E), 디아피오플라티코딘 D3(deapioplatycodin D3), 플라티코딘 D3(platycodin D3), 폴리갈락신 D2(polygalacin D2), 플라티코딘(platycodin D2), 또는 플라티코딘 D(platycodin D)의 사포닌이 함유될 수 있다(Choi et al., 2007; Han et al., 2009; Khanal et al., 2009a; Kim et al., 2005).

[0024] 또한 본 발명의 장생도라지는 20년근 이상의 도라지임을 특징으로 한다.

[0025] 본 발명에 따른 조사포닌 분획물은 장생도라지로부터 쉽게 분리할 수 있을 뿐만 아니라 안정도도 높으므로 식품, 의약품의 첨가제로 이용할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 조사포닌 분획물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 조사포닌 분획물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 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 상기 분획물에 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 액상 제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0027] 상기 조사포닌 분획물의 투여량은 치료 받을 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 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 조사포닌 분획물은 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 조사포닌 분획물은 천연물 유래의 물질이기 때문에 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0028] 또한, 본 발명은 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 건강기능식품으로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품 등이 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 장생도라지 추출물 유래의 조사포닌 분획물을 유효성분으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로 상기 조사포닌 분획물이 조골세포 분화를 촉진하는 효과가 있어 골다공증을 비롯한 골질환의 치료에 효과적이라는 것이 확인되었다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 ALP-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 일반도라지 추출물, 장생도라지 추출물 및 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물을 처리한 후 ALP의 활성을 루시페라아제 어세이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 2는 C2C12 세포에 조사포닌 분획물을 처리하여 ALP 활성을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 C2C12 세포에 BMP2와 조사포닌 분획물을 처리하여 미네랄이 생성되는 것을 본 코사 어세이로 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 C2C12 세포에 BMP2와 조사포닌 분획물을 처리하여 RT-PCR을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 OC-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 조사포닌 분획물을 처리한 후 OC의 활성을 루시페라아제 어세이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 OSE-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 조사포닌 분획물을 처리한 후 OSE의 활성을 루시페라아제 어세이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 조사포닌 분획물을 처리하여 HA(hemagglutinin)의 발현을 확인(RUNX2의 발현 확인)한 웨스턴 블롯 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드 및 OC-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 조사포닌 분획물을 처리한 후 OC의 활성을 루시페라아제 어세이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 9는 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드 및 ALP-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 조사포닌 분획물을 처리한 후 ALP의 활성을 루시페라아제 어세이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 10은 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드 및 OSE-promoter-Luc 플라스미드가 트랜스펙션 된 C2C12 세포에 조사포닌 분획물을 처리한 후 OSE의 활성을 루시페라아제 어세이를 이용하여 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

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 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0032] <실시예 1 : 조사포닌 분획물의 제조>

- [0033] 장생도라지의 추출은 (주)장생도라지로부터 구입한 장생도라지 지하부(뿌리)를 수분의 함량이 5% 이하가 되도록 건조하고 이를 분쇄한 후, 상기 장생도라지 분쇄물 0.5kg에 증류수 4ℓ를 가하고 90℃에서 5시간 동안 2회 추출한 후 여과하고 이를 동결 건조하여 장생도라지 열수 추출물 199g를 수득(수득율 : 39.8%)하였다.

- [0034] 상기 장생도라지 추출물에서 조사포닌 분획물을 추출하는 방법은 [Kim et al., 1995; Han et al., 2009; Khanal et al., 2009a]을 참고로 하였다. 상기 장생도라지 추출물(CK) 100g을 증류수에 녹여 여과한 여액을 HP-20(diaion) 컬럼에 통과시켰다. 이때 당 성분을 제외한 HP-20(diaion) 컬럼에 흡착된 유기물 성분들을 당 성분이 용출되지 않을 때까지 충분히 물로 씻어준 후 나머지는 100% 메탄올로 탈착시켜 물과 메탄올에 용해되는 성분으로 각각 분리하였다(Han et al., 2009; Khanal et al., 2009a). 메탄올에 용출된 성분들(조사포닌 분획물)은 메탄올을 감압농축시키고 나머지를 다시 소량의 메탄올에 녹여 충분히 저어주면서 에틸에테르를 가하여 침전이 형성되도록 하고 이를 여과하고 건조시켜 조사포닌 분획물(약 2.3g)을 얻었다(Choi et al., 2007; Han et al., 2009; Khanal et al., 2009a; Kim et al., 2005).

[0035] <실시예 2 : 조골세포의 분화능력 확인>

[0036] 2-1. 세포배양 및 시료처리

- [0037] 본 발명에서는 조골세포의 분화, 증식 및 활성을 확인하기 위해 통상적으로 사용되는 C2C12 세포(마우스 간엽줄기세포, mesencymal stem cell line)를 사용하였으며, 상기 C2C12 세포는 10% 또는 20%의 FBS(Fetal Bovine

Serum), 항생제(100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin), 항진균제(amphotericin B)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 이용하여, 37℃ 및 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 본 발명에 사용된 C2C12 세포는 간엽줄기세포로서, 태아의 중배엽 결합조직에 해당되는 간엽줄기세포는 조골세포, 지방세포 등으로 분화가능한 것으로 알려져 있다.

2-2 : 루시페라아제 어세이 - I

본 발명의 조사포닌 분획물의 조골세포에 대한 분화능력을 일반도라지 추출물, 실시예 1에서 제조된 장생도라지 추출물과 비교 확인하기 위해 루시페라아제 어세이를 이용하여, 조골세포 분화 마커인 ALP(alkaline phosphatase), OSE(osteoblast specific element)의 활성을 확인하였다. 상기 일반도라지 추출물은 실시예 1의 장생도라지 추출물을 제조하는 방법과 동일하게 제조하였다.

루시페라아제 유전자를 세포내로 삽입(트랜스펙션 수행함)하기 위한 플라스미드와 ALP-promoter-Luc 플라스미드는 전남대학교에서 제공받았다.

루시페라아제 어세이(luciferase assay)를 위해 C2C12 세포는 유전자(reporter construct)의 트랜스펙션 전 24 시간 동안 24-웰 플레이트에서 배양하였다. 트랜스펙션(transient transfection)은 인산화칼슘(calcium phosphate)이나 리포펙타민 플러스(Lipofectamine PLUS)를 이용하여 수행하였고, 트랜스펙션 효율은 pCMV β -갈락토시다아제(pCMV β -galactosidase)로 보정하였다.

본 발명의 조사포닌 분획물은 트랜스펙션 후 C2C12 세포에 48시간 동안 하기의 조건으로 처리하였다. 대조군에는 조사포닌 분획물에 공통적으로 사용된 용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 상기 조사포닌 분획물과 동일한 부피로 처리하였다. 일반도라지 추출물, 장생도라지 추출물도 DMSO를 용매로 사용하였다.

[세포 처리 및 트랜스펙션 조건]

① 대조군 : [ALP-promoter-Luc 플라스미드의 트랜스펙션]

② [ALP-promoter-Luc 플라스미드의 트랜스펙션] + 일반도라지 추출물 100 μ g/ml

③ [ALP-promoter-Luc 플라스미드의 트랜스펙션] + 장생도라지 추출물 100 μ g/ml

④ [ALP-promoter-Luc 플라스미드의 트랜스펙션] + 장생도라지 조사포닌 분획물 4 μ g/ml

이 후, 트랜스펙션을 수행한지 36시간 이후 세포를 용해하여 Promega에서 제작된 키트를 이용하여 각각의 유전자에 대한 루시페라아제의 활성을 확인하였고 상기 결과는 도 1에 나타내었다.

도 1을 참고하면, 본 발명의 조사포닌 분획물의 처리로 C2C12 세포에서 ALP(alkaline phosphatase)의 활성이 대조군에 비해 일반도라지 추출물은 1.52배, 장생도라지 추출물은 1.8배, 장생도라지 유래의 조사포닌 분획물은 2.3배로 ALP의 활성이 증가하였다. 따라서 장생도라지 추출물은 일반도라지 추출물에 비해 120% 정도의 APL 활성이 증가하였고, 본 발명의 조사포닌 분획물은 장생도라지 추출물에 비해 127% 정도의 APL 활성이 증가하였으며 일반도라지 추출물에 비해 151%의 APL 활성이 증가한 것으로 확인되었다.

한편, 일반도라지 추출물과 장생도라지 추출물의 농도가 각각 100 μ g/ml인 것에 반해, 본 발명의 조사포닌 분획물의 농도는 4 μ g/ml로 동일 농도로 환산할 경우 상기 조사포닌 분획물의 ALP 활성은 일반도라지 추출물에 비해 약 38배 정도 더 높았으며, 장생도라지 추출물에 비해 약 32배 높은 것으로 확인되었다.

2-3 : ALP 염색 및 본 코사 염색

본 발명의 조사포닌 분획물의 조골세포 분화능력을 확인하기 위해 C2C12 세포에 본 발명의 조사포닌 분획물을 하기의 조건으로 4일 동안 처리하여 ALP 염색(alkaline phosphatase staining)을 수행하였다. 대조군에는 조사포닌 분획물의 용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 조사포닌 분획물과 동일한 부피로 처리하였다.

[세포 처리 조건]

① 대조군

② 조사포닌 분획물 2 μ g/ml

ALP 염색을 하기 위해서 Promega에서 제조한 BCIP/NBT 용액(BCIP/NBT color development substrate)을 이용하여 이에 대한 결과를 도 2에 나타내었다.

- [0057] 도 2의 결과를 참고하면 대조군보다 조사포닌 분획물을 처리한 세포에서 ALP의 발현이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0058] * ALP(alkaline phosphatase) : 조골세포의 초기 분화 마커(marker)
- [0059] **2-4 : 본 코사 염색**
- [0060] 본 발명의 조사포닌 분획물의 조골세포 분화능력을 확인하기 위해 뼈 생성을 위한 무기질의 침착(Mineralization) 현상을 확인할 수 있는 본 코사 염색(von Kossa staining)을 수행하였다.
- [0061] 이를 위해 C2C12 세포에 하기 조건으로 BMP2와 조사포닌 분획물을 4일 동안 처리하였다. 대조군 및 BMP2만을 처리한 군에는 조사포닌 분획물의 용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 조사포닌 분획물과 동일부피로 처리하였으며, BMP2의 용매인 DMEM 세포배양 배지를 대조군에 BMP2와 동일한 부피로 처리하였다.
- [0062] [세포 처리 조건]
- [0063] ① 대조군
- [0064] ② BMP2 5ng/ml
- [0065] ③ BMP2 5ng/ml + 조사포닌 분획물 2μg/ml
- [0066] 이 후, 본 코사 염색을 위해서는 세포는 2% PFA(2% paraformaldehyde)로 세포 고정(fixation)을 하고, 수화시킨 후, 5% 질산화은 용액(5% Silver nitrate solution)으로 1시간 동안 반응시키고 다시 물로 씻어냈으며, 이 후 티오황산용액(thiosulfate solution)을 5분간 반응시켰다. 마지막으로 핵 염색(nuclear fast red stain)을 한 뒤 물로 세척하였으며, 상기 결과는 도 3에 나타내었다.
- [0067] 도 3의 결과를 참조하면, 대조군 또는 BMP2만을 처리한 세포보다 본 발명의 조사포닌 분획물 및 BMP2를 동시에 처리한 세포에서 뼈 생성을 위한 무기질의 침착(Mineralization) 현상이 활발하게 진행되고 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0068] * BMP2(bone morphogenetic protein 2) : 뼈의 생성을 촉진함
- [0069] * von Kossa staining : 뼈의 칼슘 노즐(nodule)을 염색함
- [0070] **2-5 : RT-PCR**
- [0071] 본 발명의 조사포닌 분획물이 골생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 조골세포 발현 유전자인 ALP(alkaline phosphatase)와 파골세포 발현 유전자인 RANK(receptor activator of nuclear factor-κB), RANKL(RANK ligand), OPG (osteoprotegerin)의 발현을 확인하였다.
- [0072] 이를 위해 C2C12 세포에 하기 조건으로 BMP2와 조사포닌 분획물을 3일 동안 처리하였다. 대조군 및 BMP2만을 처리한 군에는 조사포닌 분획물의 용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 조사포닌 분획물과 동일부피로 처리하였으며, BMP2의 용매인 DMEM 세포배양 배지를 대조군에 BMP2와 동일한 부피로 처리하였다.
- [0073] [세포 처리 조건]
- [0074] ① 대조군
- [0075] ② BMP2 5ng/ml
- [0076] ③ BMP2 10ng/ml
- [0077] ④ BMP2 5ng/ml + 조사포닌 분획물 1μg/ml
- [0078] ⑤ BMP2 5ng/ml + 조사포닌 분획물 2μg/ml
- [0079] C2C12 세포의 총 RNA는 트라이졸 용액(TRIzol reagent, Invitrogen)을 이용하여 추출하였으며, Invitrogen에서 제조된 랜덤 프라이머(Random primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 1μg의 RNA로 cDNA를 합성하였다.
- [0080] PCR 증폭은
- [0081] ① [denaturation] : 94℃, 1분

- [0082] ② 28-30 사이클(cycle)
- [0083] [denaturation] : 94℃, 30초
- [0084] [annealing] : 각각의 프라이머마다 다른 온도로 30초
- [0085] [extension] : 72℃, 30초
- [0086] ③ [extension] : 72℃, 5분
- [0087] 의 조건으로 수행하였으며, 프라이머(primer)의 염기서열 조건은 하기와 같았고, 상기 RT-PCR 결과는 도 4에 나타냈다.
- [0088] * ALP (alkaline phosphatase)
- [0089] forward 5' -GAT CAT TCC CAC GTT TTC AC-3'
- [0090] reverse 5' -TGC GGG CTT GTG GGA CCT GC-3'
- [0091] * RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B)
- [0092] forward 5' -TCA TCT CTG TGG TAG TAG TGG CTG-3'
- [0093] reverse 5' -TTA GGA GCA GTG AAC CAG TCG AAG-3'
- [0094] * RANKL (RANK ligand)
- [0095] forward 5' -CAG CCA TTT GCA CAC CTC ACC ATC-3'
- [0096] reverse 5' -TTT CGT GCT CCC TCC TTT CAT CAG-3'
- [0097] * OPG (osteoprotegerin)
- [0098] forward 5' -GCA CAT TTG GCC TCC TGC TAA TTC-3'
- [0099] reverse 5' -ACT CTC GGC ATT CAC TTT GGT CCC-3'
- [0100] * GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - housekeeping gene으로 internal control로 사용됨)
- [0101] forward 5' -ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
- [0102] reverse 5' -TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'
- [0103] 도 4를 참고하면, C2C12 세포에 BMP2와 본 발명의 조사포닌 분획물을 처리한 세포는 조골세포 발현 마커인 ALP(alkaline phosphatase)의 발현은 증가하지만, 파골세포 발현 유전자인 RANK(receptor activator of nuclear factor- κ B), RANKL(RANK ligand), OPG(osteoprotegerin)의 발현은 감소하고 있는 것으로 확인되었다.
- [0104] **2-6 : 루시페라아제 어세이 - II**
- [0105] 본 발명의 조사포닌 분획물의 조골세포에 대한 분화능력을 확인하기 위해 루시페라아제 어세이를 이용하여, 조골세포 분화 마커인 OC(osteocalcin), OSE(osteoblast specific element)의 활성을 확인하였다(상기 조골세포 분화 마커는 RUNX2 유전자의 타겟 유전자이기도 함).
- [0106] 루시페라아제 유전자를 세포내로 삽입(트랜스펙션 수행함)하기 위한 OSE-promotor(luc pGL3-12-OSE-luc) 플라스미드는 pGL3-luciferase(Promega)의 다중 클로닝 사이트(multiple cloning site)에 RUNX 결합 사이트(12 tandem repeats of the RUNX binding site, AACCACA)를 삽입하여 제작하였으며 OC-promoter-Luc 플라스미드는 전남대학교에서 제공받았다.
- [0107] 루시페라아제 어세이(luciferase assay)를 위해 C2C12 세포는 유전자(reporter construct)의 트랜스펙션 전 24 시간 동안 24-웰 플레이트에서 배양하였다. 트랜스펙션(transient transfection)은 인산화칼슘(calcium phosphate)이나 리포펙타민 플러스(Lipofectamine PLUS)를 이용하여 수행하였고, 트랜스펙션 효율은 pCMV β -갈락토시다아제(pCMV β -galactosidase)로 보정하였다.
- [0108] 본 발명의 조사포닌 분획물은 트랜스펙션 후 C2C12 세포에 48시간 동안 하기의 조건으로 처리하였다. 대조군에는 조사포닌 분획물의 용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 조사포닌 분획물과 동일한 부피로 처리하였다.

- [0109] [세포 처리 및 트랜스펙션 조건]
- [0110] ① 대조군 : [OC-promoter-Luc 또는 OSE-promoter-Luc 플라스미드 중의 한 가지 트랜스펙션]
- [0111] ② [OC-promoter-Luc 또는 OSE-promoter-Luc 플라스미드 중의 한 가지 트랜스펙션] + 조사포닌 분획물 $2\mu\text{g}/\text{ml}$
- [0112] 이 후, 트랜스펙션을 수행한지 36시간 이후 세포를 용해하여 Promega에서 제작된 키트를 이용하여 각각의 유전자에 대한 루시페라아제의 활성을 확인하였고 각각의 결과는 도 5 내지 도 6에 나타내었다.
- [0113] 도 5 내지 도 6을 참고하면, 본 발명의 조사포닌 분획물의 처리로 C2C12 세포에서 OC(osteocalcin)의 활성은 5배, OSE(osteoblast specific element)의 활성은 3배 이상 증가하는 것을 확인할 수 있다.
- [0114] **2-7 : 웨스턴 블롯**
- [0115] 본 발명의 조사포닌 분획물이 RUNX2의 발현을 증가시켜 조골세포의 분화를 유도하는 것을 확인하기 위해, RUNX2의 단백질 발현과 RUNX2 유전자의 타겟 유전자인 OC(osteocalcin), ALP(alkaline phosphatase), OSE(osteoblast specific element)의 활성을 확인하였다(RUNX2, OC, ALP, OSE는 대표적인 조골세포 분화 마커임).
- [0116] RUNX2 발현 플라스미드는 pCS4-3HA(CMV promoter-derived mammalian expression vector)에 RUNX2 전체 유전자를 삽입하여 제작하였다. 또한 상기 플라스미드로 유입되는 RUNX2가 잘 발현하는지 확인하기 위해 RUNX2 전체 유전자에 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)을 결합시켜 상기 플라스미드를 제작하였다.
- [0117] 먼저 RUNX2와 조사포닌 분획물과의 관계를 확인하기 위해 하기 조건으로 트랜스펙션을 수행하였으며, 조사포닌 분획물은 트랜스펙션 직후 C2C12 세포에 48시간 동안 하기의 조건으로 처리하였다. 대조군에는 조사포닌 분획물의 용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 조사포닌 분획물과 동일한 부피로 처리하였다.
- [0118] [세포 처리 및 트랜스펙션 조건]
- [0119] ① 대조군 : HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드의 트랜스펙션
- [0120] ② HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드의 트랜스펙션 + 조사포닌 분획물 $2\mu\text{g}/\text{ml}$
- [0121] ③ HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드의 트랜스펙션 + 조사포닌 분획물 $4\mu\text{g}/\text{ml}$
- [0122] 먼저 웨스턴 블롯을 수행하기 위해, 조사포닌 분획물을 처리한 세포를 파쇄하여 단백질을 추출한 후, 이를 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하고, PVDF 멤브레인으로(PVDF membrane) 이동시켰다. 이후 트랜스펙션으로 외부에서 주입된 RUNX(HA-tag) 유전자의 발현을 확인하기 위해 멤브레인을 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA) 1차 항체와 반응시키고 다시 2차 항체와 반응시켰으며 이에 대한 결과는 전용키트(chemiluminescence kit, Bio-Rad)를 이용하여 확인하였고 상기 결과는 도 7에 나타내었다.
- [0123] 도 7을 참조하면, HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드를 트랜스펙션하고 동시에 조사포닌 분획물을 처리한 C2C12 세포에서 RUNX2 단백질의 발현이 현저하게 증가되어 있는 것을 확인할 수 있다(tubulin은 housekeeping gene으로 internal control로 사용됨).
- [0124] **2-8 : 루시페라아제 어세이 - III**
- [0125] 본 발명의 조사포닌 분획물이 RUNX2의 타겟유전자인 OC(osteocalcin), ALP(alkaline phosphatase), OSE(osteoblast specific element)의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해, 상기 실시예 2-6의 조건과 동일하게 트랜스펙션을 수행하되, HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드와 OC-promoter-Luc, ALP-promoter-Luc 또는 OSE-promoter-Luc의 플라스미드를 각각 C2C12 세포에 트랜스펙션하였다. 여기에 본 발명의 조사포닌 분획물을 처리하여 RUNX2가 발현된 상태에서의 조골세포 분화 마커인 OC, ALP, OSE의 루시페라아제 활성을 확인하였다. 대조군 및 RUNX2 비교군에는 조사포닌 분획물의 용매인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 조사포닌 분획물과 동일한 부피로 처리하였다. 또한 대조군에는 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드가 없는 빈 벡터인 pCS4-3HA(CMV promoter-derived mammalian expression vector)를 트랜스펙션하였다.
- [0126] [세포 처리 및 트랜스펙션 조건]
- [0127] ① 대조군 : [OC-promoter-Luc, ALP-promoter-Luc 또는 OSE-promoter-Luc 중의 한 가지 플라스미드의 트랜스

펙션]

- [0128] ② RUNX2 비교군 : HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드의 트랜스펙션 + [OC-promoter-Luc, ALP-promoter-Luc 또는 OSE-promoter-Luc 중의 한 가지 플라스미드의 트랜스펙션]
- [0129] ③ HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드의 트랜스펙션 + [OC-promoter-Luc, ALP-promoter-Luc 또는 OSE-promoter-Luc 중의 한 가지 플라스미드의 트랜스펙션] + 조사포닌 분획물 2 μ g/ml
- [0130] 상기 OC-promoter-Luc, ALP-promoter-Luc, OSE-promoter-Luc의 플라스미드는 실시예 2-1 또는 2-6의 플라스미드를 트랜스펙션에 사용하였으며, 트랜스펙션은 실시예 2-6의 방법으로 수행하였다. 조사포닌 분획물은 트랜스펙션 후 C2C12 세포에 48시간 동안 처리하였고, 트랜스펙션 수행 48시간 후에 세포를 과쇄하여 웨스턴 블롯 및 루시퍼라아제 어세이를 수행하였으며 이에 대한 결과는 도 8 내지 도 10에 나타내었다.
- [0131] 도 8 내지 도 10의 결과를 참고하면 HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드를 트랜스펙션하였으나 본 발명의 조사포닌 분획물을 처리하지 않은 C2C12 세포에서는 대조군보다 OC, ALP, OSE의 활성이 각각 15, 8, 7배 정도 증가한 것을 확인할 수 있다. 그러나, HA(hemagglutinin)가 결합되어 있는 RUNX2 발현 플라스미드를 트랜스펙션하고 동시에 본 발명의 조사포닌 조성물을 처리한 C2C12 세포에서는 대조군에 비해 OC, ALP, OSE의 활성이 각각 50, 17, 14배 정도로 현저하게 증가하여, 본 발명의 조사포닌 분획물이 RUNX2의 발현을 증가시켜 조골세포의 분화에 영향을 주는 것을 확인할 수 있다.
- [0132] <실시예 3 : 독성시험>
- [0133] 3-1 : 경구투여
- [0134] ICR계 마우스(25g)를 10마리씩 5개의 군으로 나누어 본 발명에 따른 조사포닌 분획물을 각각 0, 2, 10, 20 및 50 μ g/kg의 용량으로 경구 투여한 후 2주간 독성여부를 관찰한 결과, 5개의 군에서 모두 생존하였다.
- [0135] 3-2 : 복강투여
- [0136] ICR계 마우스(25g)를 10마리씩 5개의 군으로 나누어 본 발명에 따른 조사포닌 분획물을 각각 0, 2, 10, 20 및 50 μ g/kg의 용량으로 복강 투여한 후 24시간 동안 독성여부를 관찰한 결과 5개의 군에서 모두 생존하였다.
- [0137] 이상의 결과에서 본 발명의 조사포닌 분획물은 급성독성이 거의 없음을 확인하였다.
- [0138] <사용예 1 : 약학적 제제예>
- [0139] 1-1 : 정제의 제조
- [0140] 본 발명의 조사포닌 분획물 20g을 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.
- [0141] 1-2 : 주사액제의 제조
- [0142] 본 발명의 조사포닌 분획물 2g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.
- [0143] <사용예 2 : 식품 제제예>
- [0144] 2-1 : 조리용 양념의 제조
- [0145] 본 발명의 조사포닌 분획물을 0.2~10 중량%로 하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.
- [0146] 2-2 : 밀가루 식품의 제조
- [0147] 본 발명의 조사포닌 분획물을 0.1~5.0 중량%로 하여 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.
- [0148] 2-3 : 스프 및 육즙(gravies)의 제조
- [0149] 본 발명의 조사포닌 분획물을 0.1~1.0 중량%로 하여 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
- [0150] 2-4 : 유제품(dairy products)의 제조

[0151] 본 발명의 조사포닌 분획물을 0.1~1.0 중량%로 하여 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0152] <사용예 3 : 음료 제조예>

[0153] 3-1 : 야채주스 제조

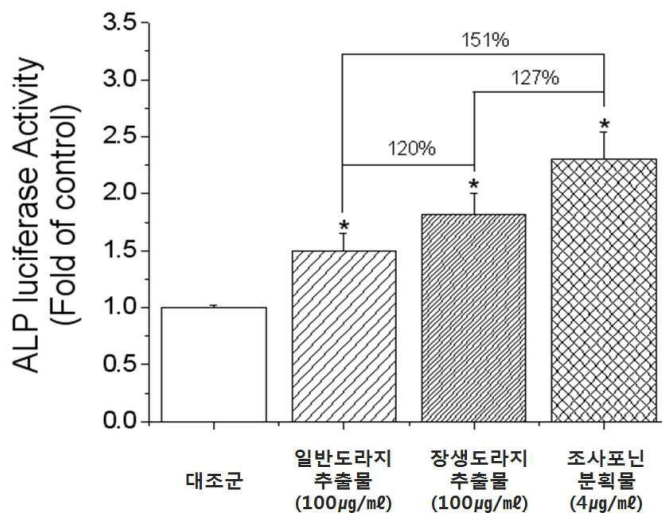
[0154] 본 발명의 조사포닌 분획물 0.5g을 토마토 또는 당근 주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0155] 3-2 : 과일주스 제조

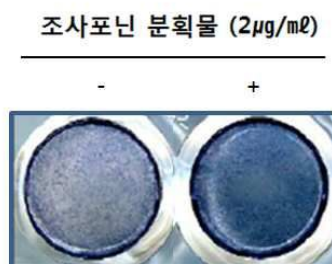
[0156] 본 발명의 조사포닌 분획물 0.1g을 사과 또는 포도 주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

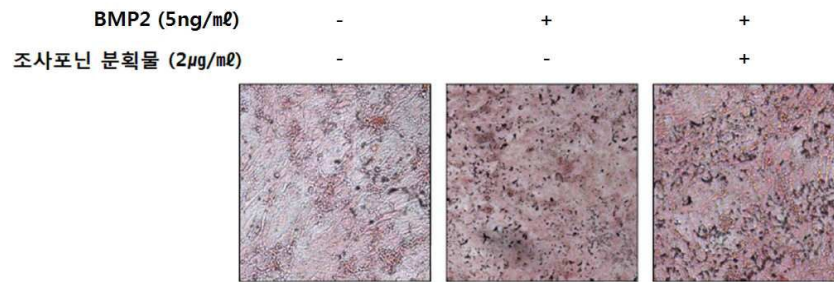
도면1



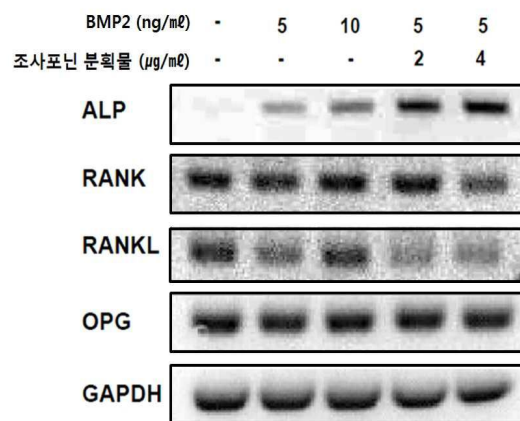
도면2



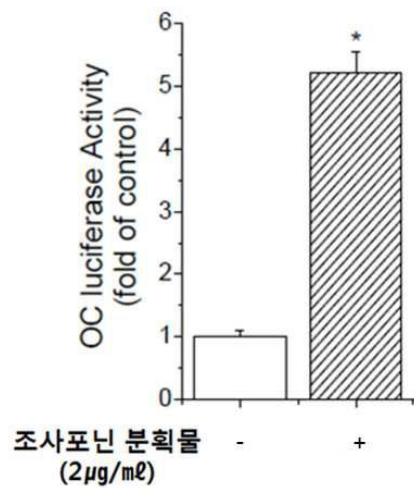
도면3



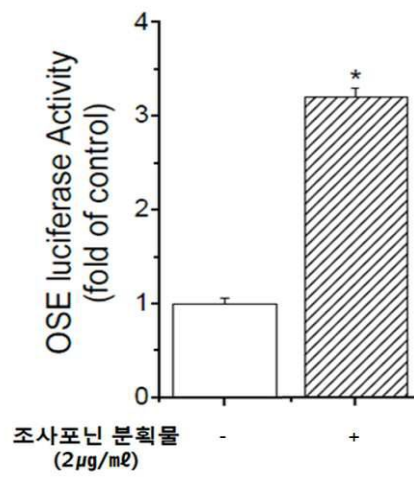
도면4



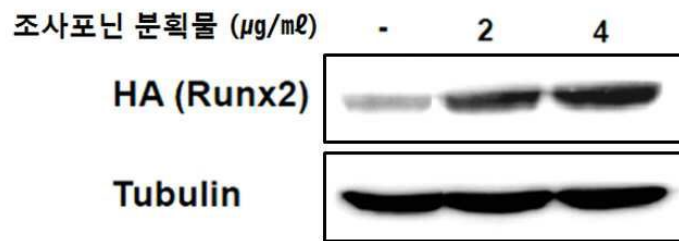
도면5



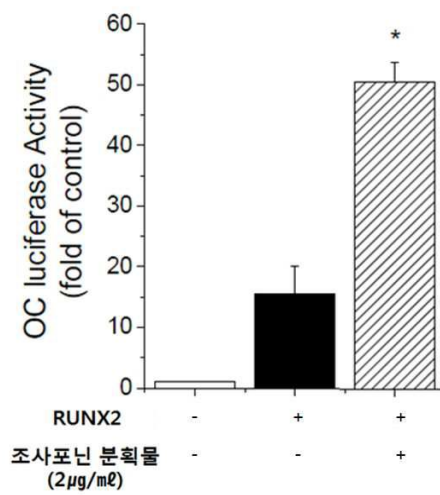
도면6



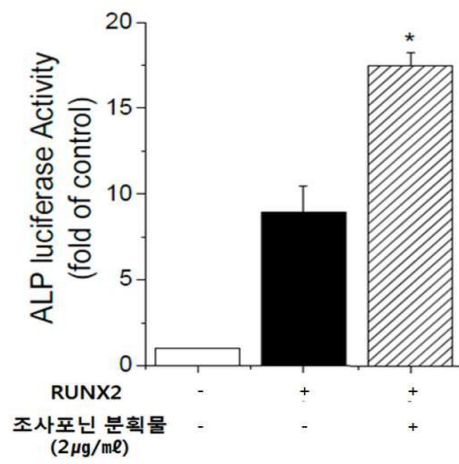
도면7



도면8



도면9



도면10

