



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월18일
(11) 등록번호 10-1949153
(24) 등록일자 2019년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/605 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61P 3/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/605 (2013.01)
A23L 29/06 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0094158
(22) 출원일자 2018년08월13일
심사청구일자 2018년08월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110108686 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
강종성
대전광역시 유성구 어은로 57, 118동 801호(어은동, 한빛아파트)
김영호
대전광역시 유성구 봉명로 48, 801동 302호(신한인스빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 3 항

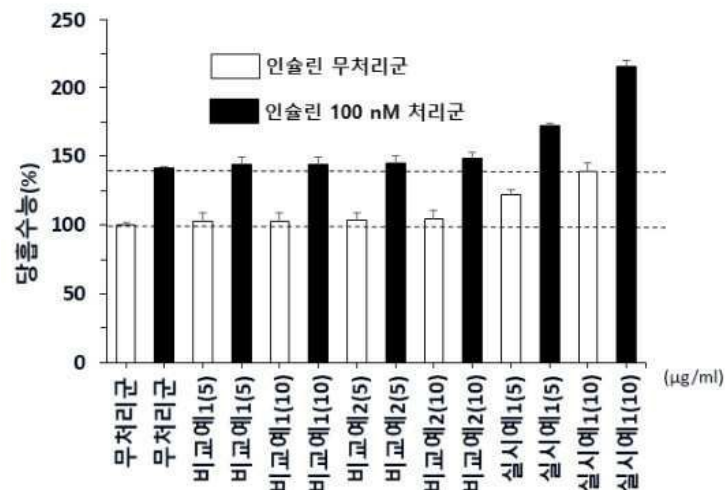
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 비스코자임(viscozyme)을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 추출물을 근육세포, 지방세포 또는 췌장세포에 처리하는 경우 당 흡수능과 인슐린 분비능을 증가시키는 효과가 우수하며, 또한, 상기 추출물을 당뇨병이 유발된 동물모델에 투여하는 경우 혈당, 당화혈색소 생성 및 인슐린 저항성을 현저하게 감소시키므로 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61P 3/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

A61K 2236/19 (2013.01)

(72) 발명자

명창선

대전광역시 유성구 대학로 59, 1212호(봉명동)

조정원

세종특별자치시 시청대로 236, 새샘마을3단지 316
동 1101호

윤민호

대전광역시 서구 계룡로583번길 12, 리가아파트
101동 204호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 315024-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 뽕나무 산물의 기능성 식, 의약 소재물질 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2015.08.14 ~ 2018.08.13

명세서

청구범위

청구항 1

뽕나무 잎 물 추출물에 1~3중량%의 비스코자임(viscozyme)을 더한 다음 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리하여 얻은 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 물 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

뽕나무 잎 물 추출물에 1~3중량%의 비스코자임(viscozyme)을 더한 다음 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리하여 얻은 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 물 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

(1공정) 뽕나무 잎 중량 대비 5~100배 부피의 추출용매인 물을 더하는 단계;

(2공정) 상기 1공정의 혼합물을 40~121℃에서 1~5시간 동안 추출하여 뽕나무 잎 물 추출물을 얻는 단계; 및

(3공정) 상기 2공정의 뽕나무 잎 물 추출물에 비스코자임을 1~3중량%로 더한 다음, 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리하는 단계;

를 포함하는 비스코자임 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 물 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비스코자임(viscozyme)을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병은 유전적, 환경적 원인에 의해 인슐린 분비 감소 및 저항성 등과 같이 인슐린 분비에 문제가 있거나 인슐린의 기능에 이상이 생겨 혈액 속의 포도당이 세포로 전달/저장되지 못하고 혈액 중에 지나치게 많아져 혈당의 수치가 정상인 보다 훨씬 높아지는 고혈당증(hyperglycemia) 증상을 보이는 대사성 질환이다. 당뇨병은 치료하지 않으면 당뇨병케톤산증, 고혈당성 혼수(Kitabachi, A. E. et al., Diabetes care, 32(7), 1335-1345, 2009), 심혈관질환, 고혈압, 뇌졸중, 만성신부전, 당뇨병성 궤양, 당뇨병망막병(WHO, Diabetes Fact sheet No.312, 2013) 등과 같은 합병증을 유발하며, 우리나라 사망원인 중 4번째로 높은 것으로 알려져 있다.

- [0003] 당뇨병의 종류는 선천적인 유전적 요인에 의해 인슐린을 신체에서 조금 생산하거나 전혀 생산하지 못하는 제1형 당뇨병(Type 1 Diabetes, T1D)과 비만, 운동부족, 임신 후 스트레스 등 환경적인 요인에 의해 발병되는 질환으로 신체에서 충분한 인슐린을 생산하지 못하거나 세포가 인슐린에 반응하지 않는 인슐린 저항성으로 발생하는 제2형 당뇨병(Type 2 Diabetes), 임신성 당뇨병(Gestational Diabetes) 및 기타 당뇨병 등으로 구분할 수 있다.
- [0004] 당뇨병의 대부분을 차지하는 제2형 당뇨병은 두 가지의 원인, 즉 인슐린 분비장애 및 인슐린 저항성의 복합 장애로 만성 고혈당 증상을 나타내어 발병하는 것으로 알려져 있다. 이 중 인슐린 분비장애는 혈당 농도에 따라 췌장의 베타세포에서 적절한 양의 인슐린이 분비되지 않는 상황을 말하며, 인슐린을 분비하는 베타세포의 양적인 감소나 기능적인 분배장애를 모두 포함한다. 한편, 인슐린 저항성은 분비된 인슐린이 혈류를 타고 표적장기에 도달했으나 그 표적세포에서 인슐린 작용 및 민감성이 저하된 상황을 의미한다. 이러한 인슐린 저항성을 나타내는 원인으로는 유전적인 원인, 비만, 육체적 활동 저하 및 고혈당 또는 이상지질혈증 등이 있다. 제2형 당뇨병은 발병 원인인 상기 두 가지의 병인이 서로 톱니바퀴처럼 복합적으로 맞물려서 발병한다. 즉, 인슐린 저항성이 있으면 저항성을 극복하기 위해 더 많은 양의 인슐린이 분비 되어야 하고, 반대로 인슐린 분비가 충분하지 않아 생긴 고혈당 자체가 다시 인슐린 저항성을 악화시킬 수 있다는 것이다(국제공개특허 제2015-016682호).
- [0005] 일반적으로 당뇨병은 유병기간이 길어질수록 만성 합병증에 의한 실명, 말기 신부전증, 신경질환, 하지 절단 및 감염질환 등이 급증하게 된다. 특히 당뇨 합병증으로서 뇌혈관질환 및 심혈관계 질환이 가장 많은 부분을 차지하고 있는데, 질환 사망자의 약 3/4은 당뇨 합병증에 의한 사망자이며, 심혈관계 합병증에 의한 사망 위험도 또한 당뇨 유병기간이 10년 증가할 때마다 24%씩 증가하는 것으로 보고되었다. 당뇨환자는 정상인에 비해 관상동맥 질환의 유병률이 2배나 높고 말초혈관질환에 대한 유병률은 약 3배 이상인 것으로 보고되었으며(고보람 등, 대한내분비학회지, 21(5), 382-388, 2006; Schneider, S. H. et al., Metabolism, 37(10), 924-929, 1988), 당뇨병에서 이러한 죽상 동맥경화를 일으키는 원인으로는 고혈당, 지질대사이상, 고인슐린혈증, 고혈압, 혈액응고 기전의 변화 등 다양하게 알려져 있다(Aronoff, S. et al., Diabetes Care, 23(11), 1605-1611, 2000). 이러한 여러 합병증들은 개개인의 삶의 질이 저하되고 사회적, 경제적인 손실 또한 매우 큰 실정이다.
- [0006] 당뇨병 관리의 가장 기본은 혈당을 조절하는 것으로, 운동요법이나 식사요법을 통해 혈당을 조절한다. 이러한 방법으로 혈당이 조절되지 않는 경우에는 약물요법을 시작한다. 제1형 당뇨병의 경우에는 인슐린 주사로 관리되고(WHO, Diabetes Fact sheet No.312, 2013), 제2형 당뇨병은 경구 혈당강하제나 인슐린의 투약으로 관리된다(김동림, 건국대학교 병원 KRC, 2012). 그러나 기존 경구 혈당강하제의 경우, 지속적인 혈당의 정상화 유지라는 긍정적인 측면 이외에 장기 복용 시 저혈당 유발, 설사, 복부팽만감, 체중증가, 젖산혈증, 심장 독성, 간 독성과 같은 다양한 부작용을 일으킬 뿐만 아니라 결국에는 인슐린 분비 기능을 하는 췌장 β 세포가 비가역적으로 손상, 파괴되고 인슐린 저항성이 생기기 때문에 결국 약효가 떨어져 인슐린을 주사해야 되는 상태가 된다. 또한 당뇨병 치료제로 가장 많이 사용되고 있는 인슐린의 경우에는 매일 2-3회 피하주사해야 하기 때문에 주사에 대한 불편함, 거부감이 크며, 이 또한 저혈당 유발 가능성이 매우 큰 문제점을 갖고 있다. 따라서 장기 복용시에도 췌장 β 세포 보호 기능을 가지면서 저혈당 유발이 없이 혈당 수치를 매우 효과적으로 낮춤과 동시에 인슐린 저항성을 획기적으로 해결할 수 있는 보다 효능이 우수하고 안전한 약물의 개발이 필요하다.
- [0007] 뽕나무(Morus alba)는 쌍떡잎식물 켄기폴목 뽕나무과 뽕나무속에 속한 낙엽 교목 또는 관목을 총칭하며, 원산지는 온대, 아열대 지방이다. 잎은 양잠용(누에먹이), 수피는 약용 또는 제지용으로 이용하며, 열매는 식용 및 약용한다.
- [0008] 뽕나무 잎은 항암, 항고혈압, 항당뇨, 항고지혈증, 항산화 및 중금속 제거 능력 등 여러 가지 생리활성을 가지고 있으며, 항고혈압, 콜레스테롤 저하 및 체지방 축적 억제에 효과가 있어 성인병 예방에 효능이 있다고 보고되었고, 장관기능, 면역 및 항염증 활성 증가 등 다양한 기능성에 대한 연구가 이루어지고 있다.
- [0009] 또한, 뽕나무 잎에는 일반적으로 수분, 탄수화물, 단백질, 스테로이드(steroids), 아미노산(amino acid) 및 비타민(vitamins) 등과 다량의 미네랄 성분이 존재하며, 그 중 주된 생리활성성분으로서 혈당강하성분인 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ), 혈압강하성분인 GABA(γ -aminobutyric acid)와 항산화성분인 루틴(rutin)을 포함한 플라보노이드(flavonoids)가 포함되어 있으며, 그 외에도 페놀산(phenolic acids), 스틸벤(stilbene) 및 2-아릴벤조푸란(2-arylbenzofuran) 유도체 등이 알려져 있다.
- [0010] 한편, 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 조성물과 관련된 종래기술로서, 선행문헌 [김영옥, 부산대학교 의학석사학위논문, 2017]에는 Viscozyme L을 이용한 뽕잎 분말의 생물전환에 대해 개시되었으며, 한국등록특허 제10-0653460호에는 뽕나무잎 추출물과 호로과 추출물을 함유한 항당뇨 조성물에 대해 개시되었고, 한국등록특허 제10-1274664호에는 뽕잎 추출물 또는 발효물을 포함하는

음료 조성물에 대해 개시되었으며, 한국등록특허 제10-1851195호에는 발효 뽕나무 잎, 발효 뽕나무 잎 추출물 및 이의 용도에 대해 개시되었고, 한국공개특허 제10-2017-0061753호에는 항산화 및 항염증활성이 증가된 발효 뽕나무 추출물의 제조방법 및 그렇게 제조된 발효 뽕나무 추출물에 대해 개시된 바 있다.

[0011] 그러나 본 발명과 같이 뽕나무 잎 추출물에 비스코자임을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물이 당 흡수능과 인슐린 분비능이 우수하며, 특히 당뇨병이 유발된 동물모델에 투여시 혈당 강하 효과, 당화혈색소 생성 감소 효과 및 인슐린 저항성을 감소시키는 효과가 우수함을 개시한 이전 보고는 아직 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0653460호, 뽕나무잎 추출물과 호로과 추출물을 함유한 항당뇨 조성물, 2006년 11월 27일, 등록.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1274664호, 뽕잎 추출물 또는 발효물을 포함하는 음료 조성물, 2013년 06월 07일, 등록.

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-1851195호, 발효 뽕나무잎, 발효 뽕나무잎 추출물 및 이의 용도, 2018년 04월 17일, 등록.

(특허문헌 0004) 한국공개특허 제10-2017-0061753호, 항산화 및 항염증활성이 증가된 발효 뽕나무 추출물의 제조방법 및 그렇게 제조된 발효 뽕나무 추출물, 2017년 06월 07일, 공개.

(특허문헌 0005) 국제공개특허 제2015-016682호, 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 당뇨병 예방 또는 치료 방법, 및 당뇨병 치료제 스크리닝 방법, 2015년 02월 05일, 공개.

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) 고보람 등, 당뇨병성 말초혈관질환과 Ankle-Brachial Index의 상관관계 대한내분비학회지, 21(5), 382-388, 2006.

(비특허문헌 0002) 김동립, 제2형 당뇨병의 약물 치료, 건국대학교 병원 KRC, 2012.

(비특허문헌 0003) 김영옥, Viscozyme L을 이용한 뽕잎의 생물전환, 부산대학교 의학석사학위논문, 2017.

(비특허문헌 0004) Aronoff, S. et al., Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group, Diabetes Care, 23(11), 1605-1611, 2000.

(비특허문헌 0005) Han, J. H. et al, The effects of propionate and valerate on insulin responsiveness for glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes via G protein-coupled receptor 41, PLoS One, 9(4), e95268, 2014.

(비특허문헌 0006) Kitabachi, A. E. et al., Hyperglycemic crises in adult patients with diabets, Diabetes care, 32(7), 1335-1345, 2009.

(비특허문헌 0007) Nakamura, T. et al., Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide, Biol Pharm Bull., 29(6), 1167-1174, 2006.

(비특허문헌 0008) Nan, M. H. et al., Construction of adiponectin-encoding plasmid DNA and gene therapy of non-obese type 2 diabetes mellitus, J Drug Target., 18(1), 67-77, 2010.

(비특허문헌 0009) Schneider, S. H. et al., Impaired fibrinolytic response to exercise in type II diabetes mellitus: Effect of exercise and physical training, Metabolism, 37(10), 924-929, 1988.

(비특허문헌 0010) WHO, Diabetes Fact sheet No.312, 2013.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 비스코자임(viscozyme)을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 비스코자임(viscozyme) 처리한 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0016] 상기 비스코자임은 뽕나무 잎 추출물에 1~3중량%로 더하고, 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리하며, 바람직하게는 pH 4~7의 뽕나무 잎 추출물에 비스코자임 1~2중량%를 더하고 40~50℃에서 10~20시간 동안 처리한다. 상기 조건을 벗어나서 비스코자임을 처리하는 경우, 효소 반응이 충분히 일어나지 않거나 과도하게 일어나서 항당뇨 활성이 낮아지게 되므로 바람직하지 않으며, 또는 항당뇨 활성 상승 폭이 크지 않아 경제적이지 않으므로 바람직하지 않다.

[0017] 상기 비스코자임은 상용 효소로서, 아스퍼질러스 아칼레아투스(*Aspergillus aculeatus*) 유래 아라비나아제(arabinase), 카보하이드라제(carbohydrase), 셀룰라아제(cellulase), 베타-글루카나아제(beta-glucanase), 헤미셀룰라아제(hemicellulase), 자일라나아제(xylanase)를 포함하며 강력한 펙틴소화효소활성(pectolytic activity)을 갖는 복합 효소이다.

[0018] 상기 뽕나무 잎 추출물은 뽕나무 잎을 물, C1 내지 C4 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물이며, 상기 C1 내지 C4의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 및 이소부탄올로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0019] 상기 뽕나무 잎 추출물의 제조시 사용되는 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용액은, 사용되는 뽕나무 잎 중량 대비 5~100배 부피(뽕나무 잎 1kg 기준 5~100 ℓ)를 사용할 수 있고, 바람직하게는 5~50배를 사용할 수 있다. 또한, 상기 과정은 1~4번까지 반복할 수 있다.

[0020] 상기 뽕나무 잎 추출물의 추출시간은 특별히 제한되는 것은 아니나, 10분 내지 1일 이내에 추출하는 것이 바람직하고, 추출방법은 통상적으로 사용되는 모든 추출방법, 예컨대, 가압 추출, 침지(냉침, 온침), 초음파 추출, 환류 추출법 등을 사용할 수 있으나, 보다 바람직하게는 1~5시간 동안 40~121℃에서 가압 추출한다.

[0021] 상기 과정으로부터 얻은 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물은 감압건조, 분무건조, 또는 동결건조 등의 통상적인 건조 방법을 이용하여 건조한 다음, 약 50~70메쉬로 분쇄하여 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명에 따른 약학 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. “약학적으로 허용 가능”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

[0023] 또한, 상기 약학 조성물은 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. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로즈, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아라비아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산프로필, 탈크, 스테아르산마그네슘 및 광물유를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 안정화제, 결합제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 추출물에 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 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 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우

린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명에 개시된 추출물을 유효성분으로 포함하는 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. 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여시간, 투여경로, 약물의 흡수, 분포 및 배설률, 사용되는 다른 약물의 종류 및 처방자의 판단 등에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.001mg/kg/일 내지 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.01mg/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.

[0025] 또한, 본 발명은 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 당뇨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 건강기능식품은 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 또는 가공한 식품을 지칭하는 것으로, 예를 들어 건강보조식품, 기능성 식품, 영양제, 보조제 등을 모두 포함한다.

[0026] 상기 추출물은 전체 식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001중량% 내지 50중량%, 더 바람직하게는 0.001중량% 내지 30중량%, 가장 바람직하게는 0.001중량% 내지 10중량%로 하여 첨가될 수 있다. 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 등이 있다.

[0027] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은

[0028] (1공정) 뽕나무 잎 중량 대비 5~100배 부피의 추출용매를 더하는 단계;

[0029] (2공정) 상기 1공정의 혼합물을 40~121℃에서 1~5시간 동안 추출하여 뽕나무 잎 추출물을 얻는 단계; 및

[0030] (3공정) 상기 2공정의 뽕나무 잎 추출물에 비스코자임을 1~3중량%로 더하고 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리하는 단계; 를 포함하는 비스코자임 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 비스코자임(viscozyme)을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 추출물을 근육세포, 지방세포 또는 췌장세포에 처리하는 경우 당 흡수능과 인슐린 분비능을 증가시키는 효과가 우수하며, 또한, 상기 추출물을 당뇨병이 유발된 동물모델에 투여하는 경우 혈당, 당화혈색소 생성 및 인슐린 저항성을 현저하게 감소시키므로 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 근육세포(C2C12)에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 당 흡수능 변화를 확인한 그래프이다.

도 2는 지방세포(3T3-L1)에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 당 흡수능 변화를 확인한 그래프이다.

도 3은 췌장세포(HIT-T15)에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 인슐린 분비능 변화를 확인한 그래프이다.

도 4는 근육세포(C2C12), 지방세포(3T3-L1) 및 췌장세포(HIT-T15)에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 세포 독성 여부를 확인한 그래프이다.

도 5는 당뇨병이 유발된 동물모델에 본 발명 실시예 및 비교예 처리 시, 경구 포도당 부하에 따른 혈당을 측정한 그래프이다.

도 6은 당뇨병이 유발된 동물모델에 본 발명 실시예 및 비교예 처리 시, 인슐린 투여에 따른 혈당을 측정한 그래프이다.

도 7은 당뇨병이 유발된 동물모델에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 혈중 당화혈색소를 측정한 그래프이다.

도 8은 당뇨병이 유발된 동물모델에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 혈장 인슐린 수치를 분석한

결과 그래프이다.

도 9는 당뇨병이 유발된 동물모델에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 인슐린 저항성 수치를 분석한 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 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 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [0034] <실시예 1. 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물의 제조>
- [0035] 뽕나무 잎 100kg에 물 1800 ℓ를 더하여 121℃에서 3시간 동안 가압 추출함으로써 뽕나무 잎 추출물 19kg을 얻었다. 상기 과정을 반복하여 얻은 뽕나무 잎 추출물 100kg에 묽은 염산을 사용하여 pH를 5.0으로 조절한 다음, 비스코자임(Celluclast 1.5L, Novozymes A/S, Denmark) 1kg을 처리(1% 비스코자임 처리)하였다. 이를 45℃에서 15시간 동안 반응하여, 본 발명 실시예 1의 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물을 얻었다.
- [0036] <비교예 1. 비교대상 뽕나무 잎 추출물의 제조①>
- [0037] 실시예 1의 조건과 동일하게 진행되 뽕나무 잎 100g에 물 1.8 ℓ를 더하고, 121℃에서 3시간 동안 가압 추출하여 비교예 1의 뽕나무 잎 추출물을 얻었다.
- [0038] <비교예 2. 비교대상 비스코자임 처리 뽕나무 잎 추출물의 제조②>
- [0039] 뽕나무 잎 100g에 물 1 ℓ를 더하여 현탁한 다음, 5% 비스코자임을 처리하고 45℃에서 48시간 동안 150rpm의 조건으로 반응한 후, 반응물에 3배 부피의 메탄올을 더하여 추출함으로써, 비교예 2의 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물을 얻었다.
- [0040] <실험예 1. 당 흡수능 및 인슐린 분비 변화 확인>
- [0041] 선행논문[Han, J. H. et al, PLoS One, 9(4), e95268, 2014]을 참고하여, 근육세포(C2C12), 지방세포(3T3-L1) 및 췌장세포(HIT-T15)의 당 흡수능과 인슐린 분비능을 확인하였다.
- [0042] 실험예 1-1. 세포 배양
- [0043] 비스코자임을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물의 해당노 효과를 확인하기 위해, 본 발명에서는 근육세포(C2C12, Cell Applications Inc., San Diego, CA, USA), 지방세포(3T3-L1, Cell Applications Inc., San Diego, CA, USA) 및 췌장세포(HIT-T15, Cell Applications Inc., San Diego, CA, USA)에서의 당 흡수능 및 인슐린 분비 변화를 확인하였다.
- [0044] 근육세포인 C2C12 세포를 10% FBS(Fetal Bovine Serum, GIBCO)와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 4.5g/L D-글루코스 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium, GIBCO) 배지에 넣고, 37℃ 및 5% CO₂ 조건(CO₂ 세포배양기, Heracell 150i, Thermo)에서 2~3일 간격으로 계대배양하였으며, 계대번호 8~10까지의 세포를 사용하였다. C2C12 근육세포가 세포배양접시(cell culture dish)에 약 80~90%의 컨플루언스(confluence)를 이루면, 0.25% 트립신-EDTA(GIBCO)를 사용하여 세포를 분리하였다. 이후, 원심분리하여 세포를 가라앉히고 10% FBS DMEM 배지를 사용하여 1mℓ 당 20만개의 세포가 되도록 희석한 다음, 24-웰 플레이트에 500μℓ씩 분주하여 플레이트가 가득 찰 때까지 배양하였다. 세포가 가득차면 4.5g/L D-글루코스 DMEM에 1% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신을 더하여 분화를 유도하였다. 분화 배지는 36시간 간격으로 3번 교체하였으며, 3번째 교체로부터 24시간 후에 마지막 분화 배지로 교체하고, 12시간 후 실험을 시작하였다.
- [0045] 마우스 지방 전구세포인 3T3-L1 세포는 10% BS(Bovine Serum, Gibco, USA)와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지를 사용하여, 37℃ 및 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 상기 배양된 세포를 24-웰 플레이트에 집종하고 증식이 90% 이상 이루어지면, 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지에 분화 유도물질인 IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine), 덱사메타손(dexamethasone) 및 인슐린(insulin)을 처리하여 3일간 분화를 유도하였다.
- [0046] 췌장세포인 HIT-T15 세포는 11.1mM 글루코스 및 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 포함된 RPMI-1640 배지를 사용하여, 37℃ 및 5% CO₂ 조건하에서 2~3일 간격으로 계대배양하였으며, 계대 번호 8~10까지의 세포를 사용하였다.

HIT-T15 췌장세포가 세포배양접시에 약 80~90%의 컨플루언스를 이루면, 0.25% 트립신-EDTA를 사용하여 세포를 분리하였다. 이후, 원심분리하여 세포를 가라앉히고 10% FBS DMEM 배지를 사용하여 1ml 당 20만개의 세포가 되도록 희석한 다음, 24-웰 플레이트에 웰당 20만개의 세포를 접종하고 2일간 배양한 후 실험을 시작하였다.

[0047] 실험예 1-2. 근육세포에서의 당 흡수능 변화 확인

[0048] 상기 실험예 1-1의 C2C12 근육세포가 완전히 분화된 후 당 흡수 실험을 시작하였으며, 분화 유도된 세포를 1X PBS(phosphate buffer saline)로 2번 세척하고 5% BSA가 첨가된 저당 DMEM(low glucose DMEM, 1g/L D-glucose, GIBCO) 배지로 교체한 뒤 37℃ 및 CO₂ 세포배양기에서 2시간 동안 안정화시켰다. 2시간 후 20% DMSO에 녹인 시료(실시에 1, 비교예 1 및 비교예 2)를 농도별(5, 10μg/ml)로 1시간 동안 처리한 다음, DMEM 배지를 모두 제거하고 KRPB 버퍼(Krebs Ringer Phosphate HEPES buffer; 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, 1.3mM CaCl₂, 118mM NaCl, 5mM KCl, 30mM HEPES, pH 7.5)로 2번 세척하였다. 5% BSA가 포함된 KRPB 버퍼로 대조군 및 시료(실시에 1, 비교예 1 및 비교예 2)를 희석하여 상기 세척된 세포에 한 번 더 처리한 뒤 30분간 반응시켰다.

[0049] 세포에 인슐린을 1mM이 되도록 처리하고 30분간 반응시킨 후, 방사활성 각테일(radioactive cocktail; KRPB buffer, 2-deoxyglucose, [3H]-glucose)을 더하여 10분간 반응한 다음, 시토허라신 B(cytochalasin B)를 포함하는 차가운 PBS로 세포를 세척하고 제거한 뒤 차가운 PBS로 2번 더 세척하였다. 이후 라이시스 버퍼(lysis buffer, PBS, 10N NaOH, 10% SDS 용액)를 더하여 4℃에서 2시간 동안 세포를 용해하였다. 상기 세포 용해물(lysate)을 각테일 용액(liquid scintillation cocktail, Ultima Gold, PerkinElmer)과 함께 전용용기에 넣고, 세포 내로 유입된 [3H]-글루코스의 값을 액체섬광계수기(Liquid Scintillation Counter, 1600 TR, Packard)로 측정하여 당 흡수능을 산출한 다음, 이를 도 1에 나타내었다.

[0050] 도 1을 참고하면, 본 발명 실시예 1의 비스코자임을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물은 비스코자임을 처리하지 않아 생물전환이 이루어지지 않은 뽕나무 잎 추출물 및 뽕나무 잎 분말에 비스코자임 처리 후 용매로 추출한 추출물에 비해 농도 의존적으로 증가된 당 흡수능을 나타내었다.

[0051] 특히, 상기 도 1에는 나타내지 않았으나, 비교예 2와 동일하게 제조하되 5%로 비스코자임을 처리하는 대신 본 발명 실시예와 같이 1%로 비스코자임을 처리하는 경우, 뽕나무 잎 분말에 포함된 여러 섬유질 성분에 의해 효소 반응이 저해되어 항당뇨 활성이 매우 낮게 나타남을 확인할 수 있었다.

[0052] 따라서, 본 발명 실시예 1과 같이 뽕나무 잎 추출물에 비스코자임을 처리한 조성물은 비교예 2와 같이 뽕나무 잎 분말에 비스코자임 처리 후 용매로 추출한 조성물에 비해, 적은 양의 비스코자임과 단시간만으로도 충분한 효소반응이 이루어지는 바, 시간과 비용을 현저하게 절감시킬 수 있으면서도 효소활성이 극대화되므로, 항당뇨 활성이 우수한 당뇨병 치료용 조성물임을 알 수 있었다.

[0053] 실험예 1-3. 지방세포에서의 당 흡수능 변화 확인

[0054] 상기 실험예 1-1의 분화된 3T3-L1 지방세포에서 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 5% BSA를 포함하는 저당 DMEM 배지로 교체하여 37℃ 및 CO₂ 세포배양기에서 1시간 동안 안정화시켰다. 1시간 후, 시료(실시에 1, 비교예 1 및 비교예 2)를 농도별(10, 20μg/ml)로 1시간 동안 처리한 다음, 배지를 모두 제거하고 KRPB 버퍼로 2번 세척하였다. 세척 후 당 흡수 반응을 유도하기 위해 100nM 인슐린을 30분 동안 처리한 다음, 방사활성 각테일(radioactive cocktail; KRPB buffer, 2-deoxyglucose, [3H]-glucose)을 더하여 10분간 반응한 후, 시토허라신 B를 포함하는 PBS를 더하여 당 흡수 반응을 정지 시켰다. 반응 정지 용액을 제거하고 라이시스 버퍼를 더하여 4℃에서 2시간 동안 세포를 용해하였다. 상기 세포 용해물을 각테일 용액과 함께 전용용기에 넣고, 세포 내로 유입된 [3H]-글루코스의 값을 액체섬광계수기로 측정하여 당 흡수능을 산출한 다음, 이를 도 2에 나타내었다.

[0055] 도 2를 참고하면, 본 발명 실시예 1의 비스코자임을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물은 비스코자임을 처리하지 않아 생물전환이 이루어지지 않은 뽕나무 잎 추출물 및 뽕나무 잎 분말에 비스코자임 처리 후 용매로 추출한 추출물에 비해 지방세포에서의 당 흡수능이 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

[0056] 따라서 도 1 및 2의 결과로부터 본 발명 실시예 1의 비스코자임을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물을 근육세포 및 지방세포에 처리하는 경우, 세포로의 당 흡수능을 증가시켜 당뇨병 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0057] 실험예 1-4. 췌장세포에서의 인슐린 분비능 변화 확인

[0058] 상기 실험예 1-1의 HIT-T15세포가 24-웰 플레이트에서 약 80% 증식을 이루면, 글루코스가 포함되지 않은 KRBH

버퍼(NaCl 119mM, KCl 4.74mM, CaCl₂·2H₂O 2.54mM, MgCl₂·6H₂O 1.19mM, KH₂PO₄ 1.19mM, NaHCO₃ 25mM, HEPES 7mM, pH7.4)로 세척한 다음, 0.3% BSA가 첨가된 KRBH 버퍼를 더하여 30분 동안 배양하였다. 이후 11.1mM의 글루코스를 포함한 KRBH 버퍼로 교체하고 시료(실시에 1, 비교예 1 및 비교예 2)를 농도별(2.5, 5 μ g/ml) 더하여 1시간 동안 처리하였다. 세포가 담겨있는 배지는 마우스 인슐린 키트(Mouse insulin kit)로 세포에서 분비된 인슐린을 측정하여 도 3에 나타내었다.

[0059] 도 3을 참고하면, 본 발명 실시예 1의 비스코자임 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물은 비스코자임을 처리하지 않아 생물전환이 이루어지지 않은 뽕나무 잎 추출물 및 뽕나무 잎 분말에 비스코자임 처리 후 용매로 추출한 추출물에 비해 췌장세포에서의 인슐린 분비능이 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

[0060] 따라서, 본 발명 실시예 1의 비스코자임을 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물은 인슐린 분비를 촉진시키는 효과가 우수하므로 당뇨병 치료에 효과적인 조성물임을 확인할 수 있었다.

[0061] 실험예 1-5. 독성평가

[0062] 당 흡수능 및 인슐린 분비능 평가와 동일한 조건으로 배양된 세포에 시료(실시에 1 및 비교예 1)를 50 μ g/ml씩 더한 다음, C2C12와 3T3-L1 세포는 2시간 동안 반응시키고 HIT-T15 세포는 1시간 동안 반응시킨 후, MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 어세이로 세포독성을 평가하였다.

[0063] MTT 시약을 500g/ml씩 각 웰에 넣고 4시간 동안 반응한 다음, MTT 시약을 제거하고 생성된 포마잔 결정을 DMSO에 용해하였다. 이를 마이크로플레이트 리더기로 450nm에서의 흡광도를 측정하여, 도 4에 나타내었다.

[0064] 도 4를 참고하면, 본 발명 실시예 1 및 비교예 1의 추출물은 근육세포, 지방세포 및 췌장세포에서 모두 세포사멸을 일으키지 않는 것으로 확인되었다.

[0065] 따라서, 본 발명 실시예 1은 세포독성이 없으면서도 당 흡수능과 인슐린 분비능이 우수하여 당뇨병 치료 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0066] <실험예 2. 동물모델에서의 항당뇨 효과 확인>

[0067] 먼저, 제2형 당뇨 동물모델 구축을 위해 5주령 수컷 C57BL/6 생쥐를 구매하여 일주일간 순화시킨 후, 22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 온도와 50 $\pm$ 5% 습도를 유지하며 12시간 주기로 명암을 조절하였다. 6주령 췌부터 고지방식이(60% Kcal)를 급여하고, 비교군에는 일반식이를 급여하였다. 8주간 고지방 식이 또는 일반식이를 급여한 후 선행논문[Nakamura, T. et al., Biol Pharm Bull., 29(6), 1167-1174, 2006; Nan, M. H. et al., J Drug Target., 18(1), 67-77, 2010]에 따라서 스트렙토마이신과 니코틴아마이드를 복합 투여하여 제2형 당뇨병을 유발시켰다. 유발 1주일 후 공복시 혈당을 측정한 다음 7주간 실시예 1(고지방식이와 비스코자임에 의해 생물전환된 뽕나무 잎 추출물 투여군), 비교예 1(고지방식이와 뽕나무 잎 추출물 투여군) 및 양성대조군(고지방식이와 메트포르민 투여군) 또는 비교예 2(고지방식이와 뽕나무 잎 분말에 비스코자임 처리 후 용매로 추출한 추출물 투여군)를 경구투여하였으며, 실험 종료 후 채취한 혈액을 분석하여 당화혈색소와 인슐린 수치 및 혈당을 측정하였다.

[0068] 실험예 2-1. 경구 포도당 부하 검사(Oral glucose tolerance test, OGTT)

[0069] 동물모델에서의 경구 포도당 부하 검사 실험을 위해, 대조군(제2형 당뇨병이 유발된 마우스를 고지방식이군), 실시예 1, 비교예 1로 나눈 각 동물군을 7주간의 실험 중 실험 종료 16시간 전에 절식 시킨 다음, 포도당 용액(2g/kg)을 경구투여하여 0, 15, 30, 45, 60, 120분 별로 생쥐 꼬리에서 혈액을 채취하였다. 상기 혈액은 혈당측정기기(Acuu-Check, Roche Diagnostics Korea Co., Ltd., Seoul, Korea)로 혈당을 측정 및 도식화하여 도 5에 나타내었다.

[0070] 도 5를 살펴보면, 본 발명 실시예 1 및 비교예 1은 포도당 부하에 따른 혈당이 2시간 이내에 조절되었으며, 특히 실시예 1은 비교예 1에 비해 탁월한 혈당 조절 능력을 나타내었다. 따라서, 본 발명 실시예 1은 당뇨병환자의 혈당을 관리하는데 효과적인 조성물임을 알 수 있었다.

[0071] 실험예 2-2. 인슐린 내성 검사(Insulin tolerance test, ITT)

[0072] 7주간의 실험 중 실험 종료 3일전(6주 4일째), 인슐린 내성 검사 실험을 위해 각 동물군을 16시간 전에 절식 시킨 다음, 포도당 용액(2g/kg)을 경구투여하고 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 30분 후 인슐린(1U/kg)을 피하주사하고, 0, 15, 30, 60, 120분째에 생쥐 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당측정기기로 혈당을 측정 및 도식화하여 도 6에 나타내었다.

- [0073] 도 6을 살펴보면 본 발명 실시예 1 및 비교예 1은 인슐린 투여에 의한 혈당 조절기능이 확인되었으며, 특히 실시예 1을 600mg/kg로 투여한 군의 경우 메트포르민(metformin) 300mg/kg 투여군과 유사한 혈당 감소 효과를 나타내었다.
- [0074] 이에, 본 발명 실시예 1을 투여하는 경우 제2형 당뇨병모델 동물에서 인슐린 투여에 의한 혈당조절이 정상으로 이루어짐을 확인할 수 있었다.
- [0075] **실험예 2-3. 혈중 당화혈색소 수치 측정**
- [0076] 7주간의 실험 중 실험 종료 16시간 전 실험동물을 절식 시킨 다음, 혈액을 안와채혈하였다. 공복시의 당화혈색소(HbA_{1c})수치는 마우스 헤모글로빈 A_{1c}키트(mouse Hemoglobin A_{1c} kit, Crystal Chem, Downer Grove, USA)를 사용하여 마이크로플레이트 리더기의 700nm에서 흡광도로 측정하여, 도 7에 나타내었다.
- [0077] 도 7을 살펴보면, 본 발명 실시예 1은 비교예 1 및 비교예 2에 비해 혈중 당화혈색소의 수치가 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터, 실시예 1을 투여하는 경우 제2형 당뇨병모델 동물의 혈중 포도당을 감소시킴으로써 혈중 당화혈색소 생성이 감소됨을 알 수 있었다.
- [0078] **실험예 2-4. 혈장내 인슐린 수치 측정**
- [0079] 7주간의 실험 중 실험 종료 16시간 전 실험동물을 절식 시킨 다음, 혈액을 안와채혈하고 4℃, 4000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장에서의 공복시 인슐린 수치는 마우스 인슐린 ELSIA 키트(mouse insulin ELSIA kit, Shibayagi, Shibukawa, Japan)를 사용하여 마이크로플레이트 리더기의 450nm에서 흡광도를 측정하여, 도 8에 나타내었다.
- [0080] 도 8을 살펴보면, 본 발명 실시예 1은 비교예 1에 비해 혈장인슐린 수치 증가 효과가 우수하여, 제2형 당뇨병모델 동물에서 인슐린 분비를 증가시킴으로써 당뇨 증세를 완화시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- [0081] **실험예 2-5. 인슐린 저항성 지표 산출(Homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR)**
- [0082] 제2형 당뇨병이 유발되는 경우 공복시 혈당 증가 및 이로 인한 췌장 β-세포에서의 인슐린 분비가 과도하게 일어나지만, 종말기관(지방조직, 골격근 등)에서 인슐린에 대한 작용이 원활하게 일어나지 않아 고혈당을 나타내는 경우 인슐린 저항성으로 볼 수 있다.
- [0083] 본 발명에서는 인슐린 저항성 정도 및 β-세포의 기능(인슐린 분비능)을 평가할 수 있는 지표인 HOMA-IR 수치를 사용하였으며, 실험예 2-5의 실험 종료 후 공복시 혈당과 혈장 인슐린 수치 값을 하기 수학적 식 1에 대입하여 인슐린 저항성 지표를 산출할 수 있었고, 이를 도 9에 나타내었다.
- [0084] [수학적 식 1]
- [0085]
$$HOMA-IR = \frac{Fasting\ insulin(uU/mL) \times Fasting\ glucose(mg/dL)}{405}$$
- [0086] 도 9를 참고하면, 본 발명 실시예 1은 비교예 1에 비해 HOMA-IR 수치가 감소하였는데, 특히 실시예 1을 600mg/kg로 투여하는 경우 양성대조군인 메트포르민(metformin) 300mg/kg을 투여한 경우와 유사한 정도로 인슐린 저항성이 감소하는 조성물임을 확인할 수 있어, 당뇨병의 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0087] **<제제예 1. 정제의 제조>**
- [0088] 본 발명 실시예 1의 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물 20g을 각각 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.
- [0089] **<제제예 2. 캡슐제의 제조>**
- [0090] 본 발명 실시예 1의 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물 100mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0091] **<제제예 3. 주사제의 제조>**

[0092] 본 발명 실시예 1의 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0093] <제제예 4. 건강기능식품의 제조>

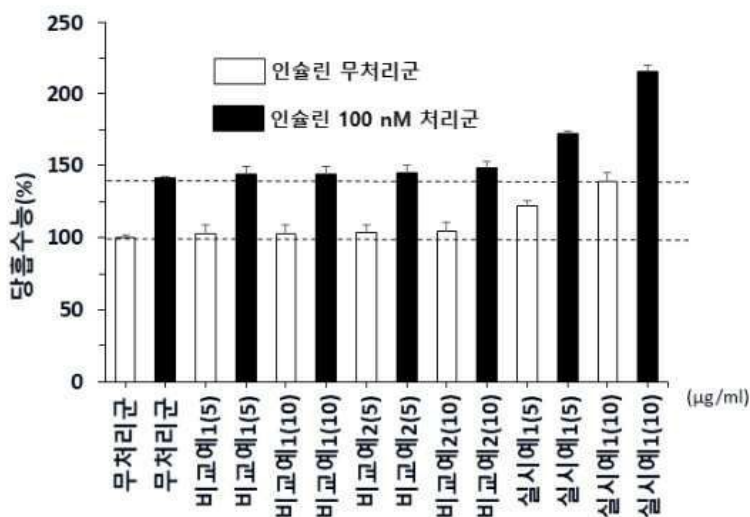
[0094] 본 발명 실시예 1의 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물 20g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0095] <제제예 5. 건강기능성 음료의 제조>

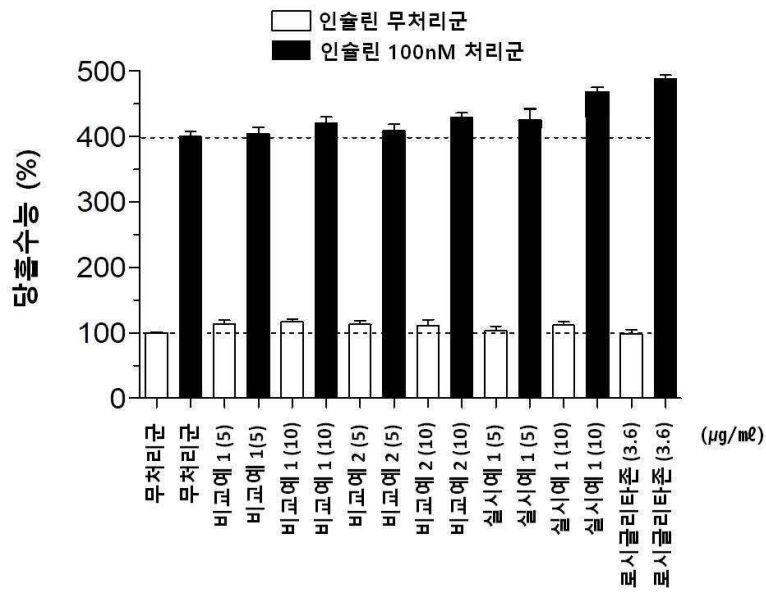
[0096] 본 발명 실시예 1의 비스코자임 처리한 뽕나무 잎 추출물 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

도면

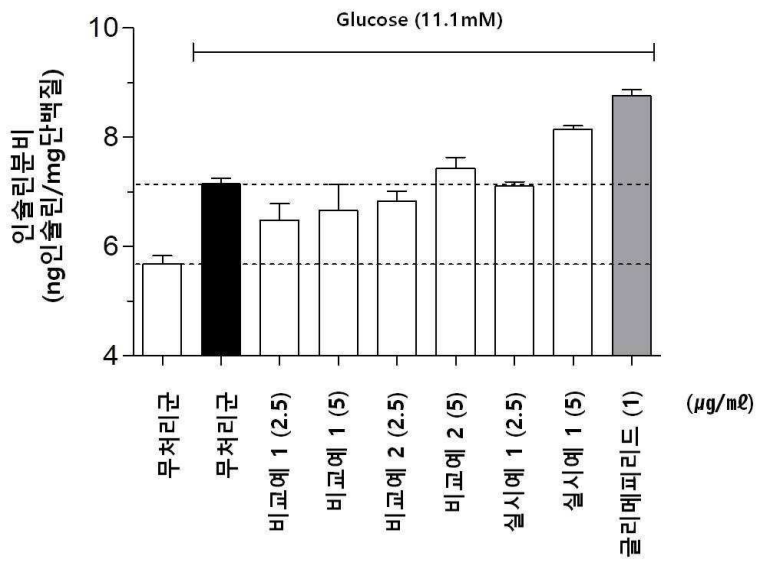
도면1



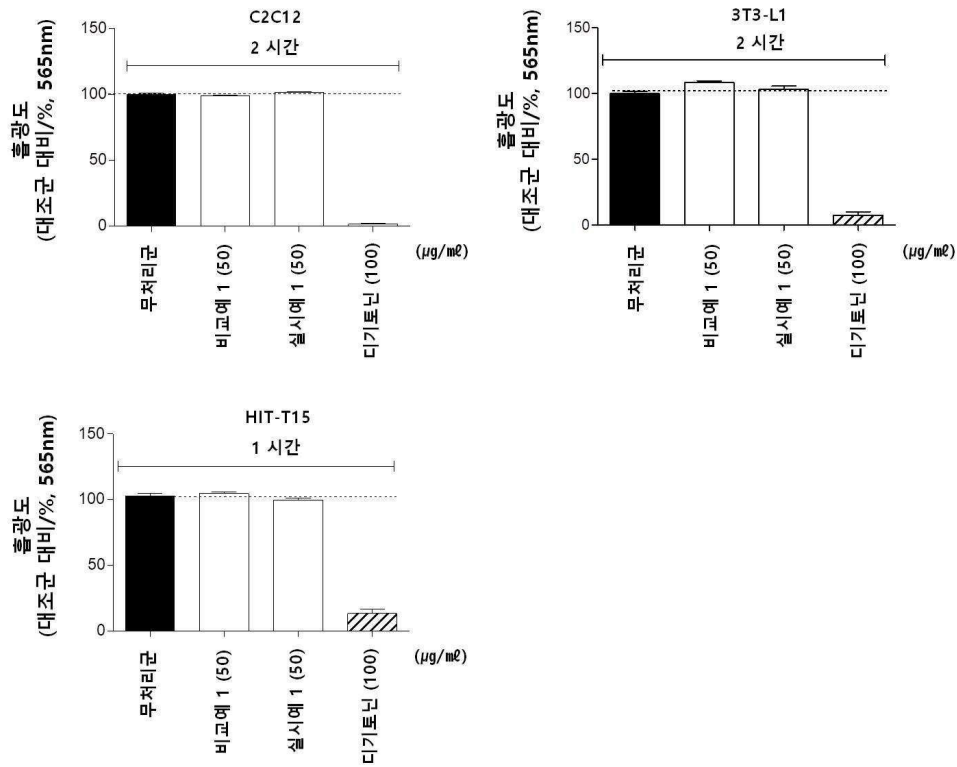
도면2



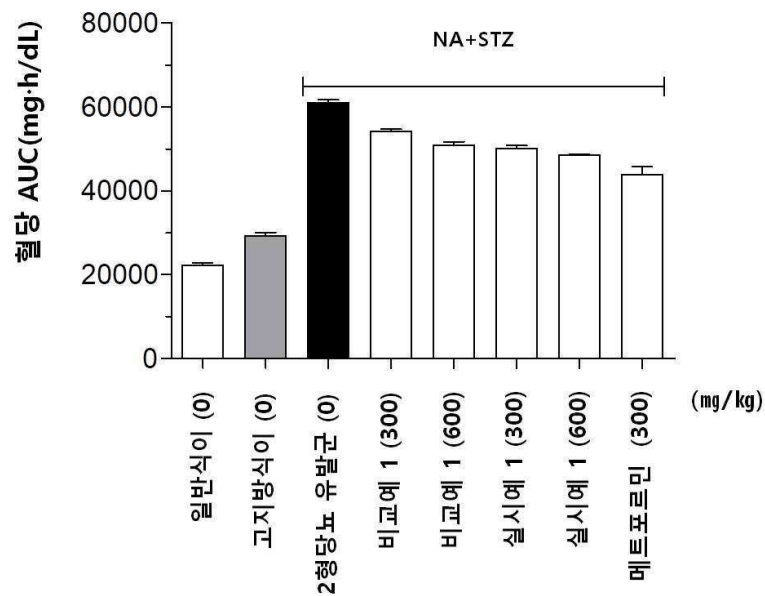
도면3



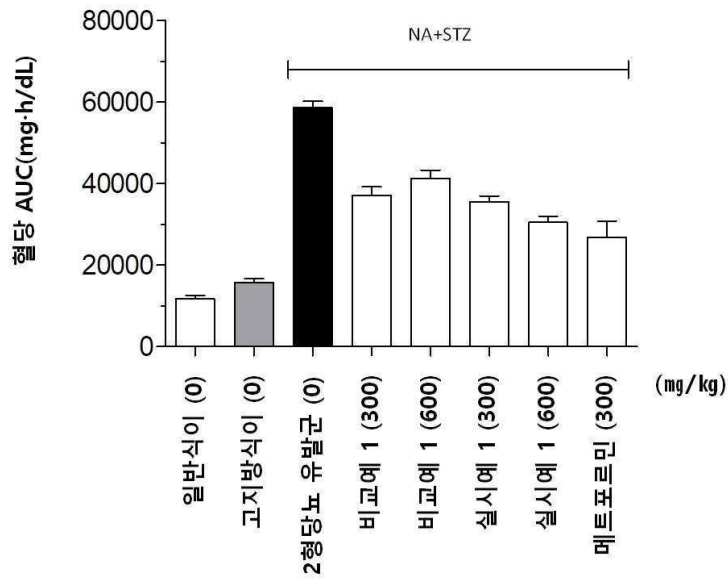
도면4



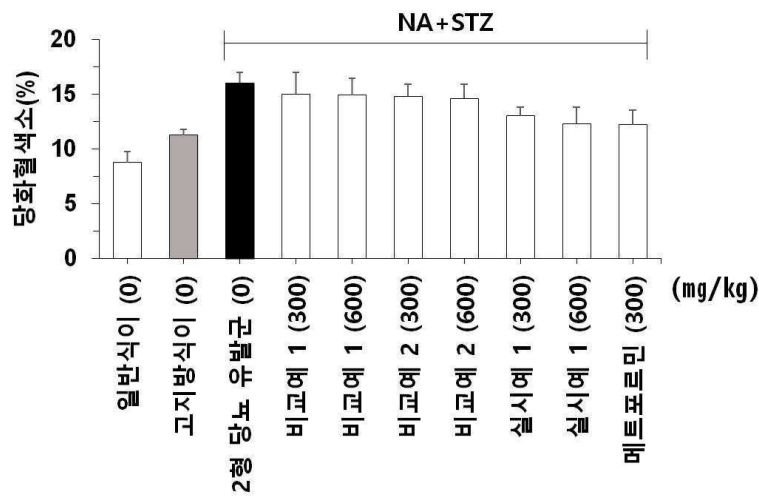
도면5



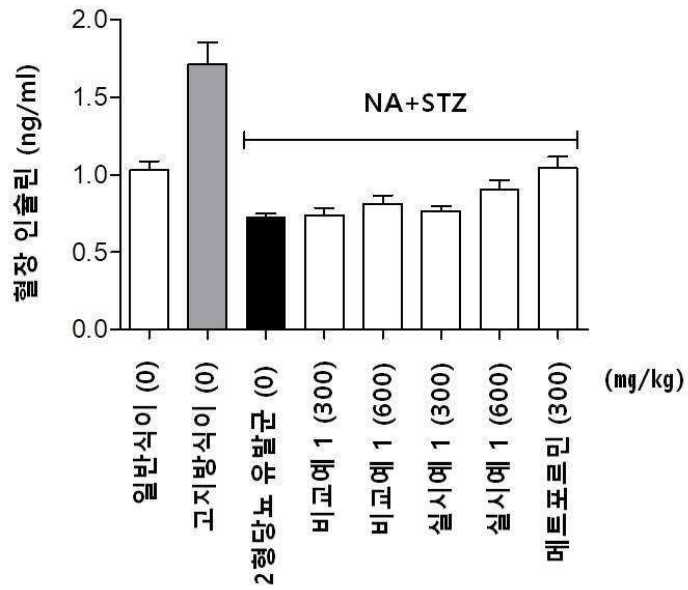
도면6



도면7



도면8



도면9

