



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0011694
(43) 공개일자 2009년02월02일

(51) Int. Cl.⁹

A61K 36/346 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0075549

(22) 출원일자 2007년07월27일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

주식회사 장생도라지

경남 진주시 금곡면 정자리 1218-9

정혜광

광주광역시 동구 산수동 두암타운아파트 102-803

(72) 발명자

정혜광

광주광역시 동구 산수동 두암타운아파트 102-803

김형균

광주 북구 신안동 남양파크 604호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

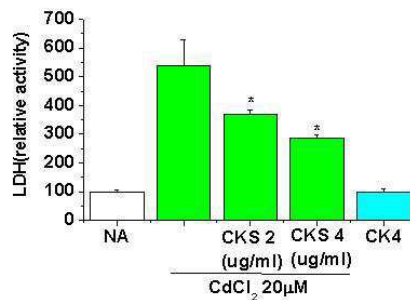
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 장생도라지 정제분획물을 유효성분으로 함유하는카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 다년생 도라지인 장생도라지 정제분획물을 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 장생도라지 정제분획물은 카드뮴독성에 대한 세포 생존능 증가 및 활성 산소 종(reactive oxygen species : ROS) 억제 효과를 나타내어 카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 치료용 약학조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

정영철

경남 진주시 하대2동 하대현대아파트 101동 2007호

이영춘

경남 진주시 상대동 상대한보아파트 104동 901호

특허청구의 범위

청구항 1

장생도라지 정제 분획물을 유효성분으로 함유하는 카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 정제분획물은 장생도라지 추출물을 이온교환수지를 통하여 얻어지는 조사포닌 정제 분획물인 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 카드뮴중독 관련 질환은 신장결석증, 이파이이파이병, 암 또는 신경퇴행성 질환인 약학 조성물.

청구항 4

장생도라지 정제분획물을 유효성분으로 함유하는 카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제 4항에 있어서, 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제인 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 장생도라지 정제분획물을 유효성분으로 함유하는 카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한것이다.

배경 기술

- <2> [문헌 1] Tsuchiya K., *Keio J Med*, 18, p.181, 1969
- <3> [문헌 2] Arabi M, Heydarnejad MS., *Zhonghua Nan Ke Xue*, 13, p.291, 2007
- <4> [문헌 3] 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
- <5> [문헌 4] 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
- <6> [문헌 5] Lee JS, Jeong EJ, Jeong HY., *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 25, p.986, 1996 ; K.S. Kim, O. Ezaki, S. Ikemoto, H. Itakura., *J. Nur. Sci. Vitaminol*, 41, p.485, 1995
- <7> [문헌 6] Kyung Jin Lee, Chul Yung Choi, Young Chul Chung, Young Sup Kim, Si Yung Ryu, Seong Hwan Roh and Hye Gwang Jeong., *Toxicology Letters*, 147, p271, 2004
- <8> [문헌 7] Kyung Jin Lee, Chul Yung Choi, Young Chul Chung, Young Sup Kim, Si Yung Ryu, Seong Hwan Roh and Hye Gwang Jeong., *Toxicology Letters*, 147, p271, 2004
- <9> [문헌 8] Ji Young Kim, Dong Hee Kim, Hyung Gyun Kim, Gyu-Yong Song, Young Chul Chung, Seong Hwan Roh, Hye Gwang Jeong, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 210, p150, 2006

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 급속한 개발과 산업화에 따라 전 세계적으로 화학물질의 사용량이 증가하고 있어, 이미 생태계의 자연 정화능력을 상회하는 오염물질이 배출되고 있다. 이로 인한 자연환경의 파괴와 사람의 건강에 대한 피해가 가시화되고 있으며 유해물질 피해에 따른 환경 분쟁이 심화되고 있으며 이에 국제적으로 환경오염의 원인물질로써의 유해물질 관리의 중요성이 인식되고 있다.
- <11> 자동차 산업, 중화학 공업, 기계 공업 등 고도 산업화 사회에서 부수적으로 발생하는 환경오염 물질인 카드뮴, 납 등의 중금속도 동반생산이 야기되고 있으며 특히, 탄광촌 진폐증 환자나 철공소, 조선소, 자동차업체에 근무하는 근로자들이 중금속에 오염될 확률이 높으며 이에 따른 간접적인 산업 능률 저하로 경제적 피해의 잠재성이 높다.
- <12> 카드뮴은 오염된 환경으로 인해 식품, 식수, 공기, 흡연 등을 통하여 인체로 들어올 수 있으며, 장기간 노출 시 체내에 축적되어 장애를 유발시키며 우리나라에서의 전국적인 카드뮴 식이 섭취량에 대한 정확한 보고가 없으나 음식을 통한 카드뮴 섭취는 1인당 평균 55- 84 $\mu\text{g/day}$ 로 추정되어 카드뮴에 의한 영향을 무시할 수 없다.
- <13> 1950년대 일본 폐광지역에서 만성 카드뮴 중독에 의한 피해사례가 나타나면서 알려지기 시작한 이타이 이타이병은 농작물과 식수로 흘러들어간 카드뮴 성분이 체내에 축적되었으며 카드뮴에 오염된 식수를 장기간 (약 30년) 먹고 있는 주민 중 중년 여성 258명(약 20년간)이 카드뮴 중독증을 일으키고 그 중 128명이 사망하였다(Tsuchiya K., *Keio J Med*, 18, p.181, 1969).
- <14> 이타이이타이병은 농작물과 식수로 흘러들어간 카드뮴 성분이 체내에 축적되면서 신장장애와 함께 골연화증, 요통, 관절통, 사지근육통 등의 증상을 나타내는 무서운 공해이다.
- <15> 최근 경남 고성군 폐광촌에서 공해병인 이타이이타이병에 걸린 것으로 의심되는 환자가 집단으로 발생했으며 옛 구리광산에 사는 주민 7명의 혈중 카드뮴 농도를 조사했더니 6명의 수치가 2.51-6.64 ppb로 일반인 함유기준치인 2 ppb 이하를 크게 넘는 것으로 나타났으며 혈중 조사 외에 소변 조사에서도 7명 모두가 3.8-11.59 ppb의 수치를 나타내 신장의 카드뮴 축적상태가 심각한 수준으로 나타났다.
- <16> 고성군 뿐 아니라 경남도내 폐광 가운데 46곳의 토양오염도 의심되고 있으며 담배, 음료수, 석유화학제품, 플라스틱, 타이어 연소, 제련소, 카드뮴 도금, 건전지 공장, 대기 농도가 증가, 생활쓰레기 소각연기(고무, 플라스틱), 그림도구, 도금제품, 오염된 어패류, 유한 화학비료를 사용한 토양과 작물 등의 다양한 곳에서 카드뮴이 우리 몸에 축적되고 있다.
- <17> 따라서 카드뮴 중독을 사전에 예방하고, 식품이나 식품첨가물, 의약품, 기타 화학물질들을 안전하게 사용함으로써 중금속 중독에 대한 위협으로부터 보호하고, 국민건강을 증진시킬 수 있다.
- <18> 오늘날 국내·외에 상업적으로 사용되는 80,000종 이상의 화학물질이 이미 등록되고 있으며 해마다 수천 개의 새로운 물질이 식품, 의약품, 화장품, 의료용구 등의 원료로 사용되고 있다. 그러나 이러한 물질들의 인체나 환경에 미치는 독성작용과 인체에 독성을 유발할 수 있는 노출 수준을 정확하게 규명하고 있지 못하고 있다.
- <19> 합성물질뿐만 아니라 자연적으로 생성되는 물질들에 대한 인체유해영향의 평가는 인체 노출수준에 따른 물질의 독성작용 규명에 의해서 이루어지며, 우리나라 실정에 부합하는 인체 유해성 평가를 위해서는 국내 유통 중인 독성물질에 대한 오염도와 사용량 자료, 용량별 인체독성 자료가 필요하다.
- <20> 우리나라 국민의 혈중 수은과 카드뮴 농도가 미국과 독일 등 일부 선진국에 비해 3-8배가 높은 것으로 나타났으며 이 중금속은 체내에 다량 축적되면 암과 신장질환은 물론 정신장애를 일으키는 치명적인 중금속이다.
- <21> 환경부는 최근 2005년 3월부터 11월까지 10개월간 보건복지부 질병관리본부와 공동으로 전국 20살 이상 국민 2천명을 대상으로 실시한 ‘국민 혈중 중금속농도 조사’ 결과를 한 결과 중금속인 수은과 납, 카드뮴을 대상으로 한 이 조사에서 카드뮴의 혈중 평균 농도는 1당 1.52g으로 이 수치는 서양권인 독일의 0.41g과 전주면 4배나 높게 나왔으며 남성보다는 여성의 카드뮴 수치가 높은 것으로 조사되었다.
- <22> 이타이이타이병은 카드뮴 중독에 의해 뼈 속의 칼슘성분이 녹아 신경장애와 골연화증이 일어나며 1979년까지 통계를 보면 130명의 환자 중 90%가 65세 이상의 노인이고 남자 3명 외에는 전부 여자였으며 중년의 다

산경험이 있는 여성에게 많이 나타난다. 외국의 한 조사에 따르면 흡연자는 정자 속 카드몐농도가 증가해 2세가 선천성 기형 등을 일으킬 가능성이 높다고 보고 하였다(Arabi M, Heydarnejad MS., *Zhonghua Nan Ke Xue*, 13, p.291, 2007).

<23> 또한, 어린이들이 즐겨 찾는 놀이터의 흙 속에서도 납 등 중금속이 기준치 이상으로 나왔으며 경남도 보건환경연구원이 어린이 놀이터 159곳을 대상으로 중금속 오염실태를 조사한 결과 32.1%인 51곳이 자연 상태의 함유치 보다 오염도가 높은 것으로 나타났으며 최근에는 기준보다 훨씬 낮은 농도의 중금속에 노출되더라도 어린이들의 신경계통 등에 악영향을 미칠 수 있다는 검사결과가 나와 중금속 중독에 대한 위기감을 고조시키고 있다.

<24> 매년 우리나라 황사 발생량은 최고 1백만 톤으로 추정되는데, 해를 거듭할수록 황사가 점점 독해지고 있으며 중국의 산업화로 인해 황사 안에 납, 카드몐 등 중금속이 다량 함유되어 이로 인해 호흡기와 눈, 신장 질환이 발생할 수 있다.

<25> 사회적으로 공단뿐만 아니라 대도시 주거 자들은 매일 분출되는 자동차 매연 등의 공해축적으로 도시 주거환경은 날로 악화되고 있으며 우리가 매일 먹고 마시는 공기, 물, 식품에서 오는 중금속의 체내 축적을 가 능한 한 최소화함으로써 건강한 사회적 환경을 조성할 필요성이 있다.

<26> 도라지 (길경 *Platycodon grandiflorum* A. DC)는 배농, 거담, 기관지염, 천식 등의 호흡기계 질환에 사용되어온 생약재로서, 도라지가 배합되어 있는 한방 처방의 수가 동의보감에 273건, 방약합편에 49건에 이를 정도로 다양한 약리작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

<27> 이러한 도라지의 주요 약리성분은 테르펜계 사포닌이며, 이 약리성분은 동물실험을 통하여 진해, 거담작용, 중추신경억제작용 (진정, 진통, 해열효과), 급만성 염증에 대한 항염증작용, 항괴양 및 위액분비 억제작용, 혈관을 확장하여 혈압을 낮추는 항콜린작용, 혈당강하작용, 콜레스테롤 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).

<28> 이외에도 도라지의 열수 및 에탄올 추출물은 곰팡이의 아프라톡신을 억제하며, 이눌린 분획은 식균작용 과 고혈압 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).

<29> 이러한 도라지의 다양한 약리작용에도 불구하고 장기간 재배에 어려움이 있어 개발이 쉽지 않았으나 최근에는 20년 이상의 도라지를 재배할 수 있는 기술이 개발되어 다량 생산이 가능해졌기에 (이성호, “다년생도라지재배법”, 대한민국 특허 제 045731호) 이를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 장생도라지에 관한 연구는 항당뇨효과에 관한 실험, 고지혈증에 관한 실험, 항암 및 면역질환에 관한 실험 등이 있으며, 신장독성 예방 및 손상억제에 대한 연구 등이 계속되고 있다 (Lee JS, Jeong EJ, Jeong HY., *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 25, p.986, 1996 ; K.S. Kim, O. Ezaki, S. Ikemoto, H. Itakura., *J. Nur. Sci. Vitaminol*, 41, p.485, 1995).

<30> 이에 본 발명자들은 장생도라지의 정제분획물을 사용하여 카드몐 독성에 대한 세포 생존능 증가, 활성산소에 대한 억제 및 MT유전자의 발현의 증가에 있어서 탁월한 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

<31> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 장생도라지 정제분획물을 유효성분으로 함유하는 카드몐중독 관련 질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

<32> 본 발명과 관련된 카드몐중독 관련 질환으로는 카드몐 인체 축적으로 인한 소화기 증상, 기관지염, 폐기종, 빈혈, 신장결석증, 당뇨, 단백뇨, 아미노산뇨, 이파이이파이병, 고혈압, 기형유발, 돌연변이, 암, 신경퇴행성 질환을 포함하며, 바람직하게는 신장결석증, 이파이이파이병, 암, 신경퇴행성 질환을 포함한다.

<33> 또한 본 발명은 장생도라지 정제분획물을 유효성분으로 함유하는 카드몐중독 관련 질환의 예방 및 개선용

건강기능식품을 제공한다.

<34> 본원에서 정의되는 “정제 분획물”은 장생도라지 추출물을 이온교환수지를 통하여 얻어지는 올리고당이 다량 함유된 (1) 올리고당 정제 분획물 (이하, "CKO"라 명명함); (2) 이눌린 정제 분획물 (이하, "CKI"라 명명함); (3) 사포닌 성분이 다량 함유된 조사포닌 정제 분획물 (이하, "CKS"라 명명함)을 포함하며, 보다 바람직하게는 (3) 사포닌 성분이 다량 함유된 조사포닌 정제 분획물 (이하, "CKS"라 명명함), 보다 더 바람직하게는, 하기 제 조공정으로 분리가능한 정제분획물을 포함한다.

<35> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<36> 본 발명의 추출물은 장생도라지를 수분의 함량이 5 % 이하가 되도록 건조하고 이를 분쇄한 후, 추출 용 매로 물, 탄수소 1 내지 4의 저급알코올, 바람직하게는 물 또는 에탄올을 보다 바람직하게는 물을 장생도라지 분말의 0.5 내지 30배, 바람직하게는 5 내지 15배 부피량을 10 내지 100℃, 바람직하게는 40 내지 95℃의 추출 온도에서 0.5 내지 48시간, 바람직하게는 2 내지 10시간 동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 가열추출 등의 추출방법으로, 바람직하게는 열수추출법으로 1 내지 7회, 바람직하게는 1 내지 3회 추출한 후 여과하고 동결 건조하여 본 발명의 장생도라지 조추출물을 수득할 수 있다.

<37> 또한 본 발명은 상기 제조방법으로부터 얻어진 장생도라지 조추출물로부터 카드뮴중독에 관련된 질환에 대한 효과를 갖는 정제 분획물을 제조할 수 있다.

<38> 구체적으로, 본 발명은 상기 제조방법으로부터 얻어진 장생도라지 조추출물을 물에 녹여 여과한 여과액을 HP-20 컬럼과 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, 이 물 가용 분획물로부터 각각 올리고당이 다량 함유된 (1) 올리고당 정제 분획물 (이하, "CKO"라 명명함) 및 (2) 이눌린 정제 분획물 (이하, "CKI"라 명명함) 얻고, 이 저급알콜 가용분획물에 에틸에테르 등과 같은 비극성 용매를 가하여 침전된 침전물로부터 사포닌 성분이 다량 함유된 (3) 조사포닌 정제 분획물 (이하, "CKS"라 명명함)을 얻는 제조방법 및 이 제조방법으로부터 수득된 각 정제 분획물을 제공한다.

<39> 따라서, 본 발명은 장생도라지를 건조, 분쇄한 후, 물 또는 에탄올을 추출용매로 하여 열수추출법으로 추출한 후 수득한 장생도라지 조추출물을 물에 녹여 여과한 여과액을 HP-20 컬럼과 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, 이 물 가용 분획물로부터 각각 올리고당이 다량 함유된 올리고당 정제 분획물 및 이눌린 정제 분획물을 얻고, 이 저급알콜 가용 분획물에 에틸에테르 등과 같은 비극성 용매를 가하여 침전된 침전물로부터 사포닌 성분이 다량 함유된 조사포닌 정제 분획물을 얻는 상기 정제분획물을 제조하는 제조방법을 제공한다.

<40> 본원에서 정의되는 “정제 분획물”은 상기 제조방법으로부터 분리되는 올리고당 정제 분획물, 이눌린 정제 분획물 및 조사포닌 정제 분획물을 포함한다.

<41> 또한 본 발명의 장생도라지는 20년근 이상의 도라지임을 특징으로 한다.

<42> 본 발명의 카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 치료용 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출 물을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다.

<43> 상기 추출방법에 의해 얻어진 장생도라지 정제분획물의 카드뮴독성에 대한 세포 생존능 증가 및 활성 산소종 억제효과를 확인한 결과 탁월한 효과를 나타냄을 확인하였다.

<44> 본 발명은 상기의 제조방법으로 얻어진 장생도라지 정제분획물을 유효성분으로 함유하는 카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

<45> 본 발명의 카드뮴중독 관련 질환에 관한 치료용 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 정제분획 물을 0.1 내지 50 중량%, 바람직하게는 2내지 5 중량%, 보다 바람직하게는 2 내지 3 중량%로 포함한다.

<46> 본 발명의 정제분획물을 포함하는 치료용 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담 체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<47> 본 발명에 따른 정제분획물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하

여 사용될 수 있으며, 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트 로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제 화할 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, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 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), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<48> 본 발명의 정제분획물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<49> 본 발명의 장생도라지 정제분획물을 포함하는 조성물은 쥐, 생쥐, 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(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

<50> 또한, 본 발명은 카드뮴중독 관련 질환의 개선 효과를 나타내는 장생도라지 정제분획물을 유효성분으로 포함하는 카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

<51> 본 발명의 장생도라지 정제분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 카드뮴중독 관련 질환을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 장생도라지 분획물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

<52> 본 발명의 장생도라지의 분획물 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

<53> 본 발명의 상기 정제분획물은 카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

<54> 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 정제분획물을 함유하는 것 외에 액체 성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

<55> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을

함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

효 과

<56> 본 발명의 장생도라지 정제분획물은 카드뮴중독에 의한 간세포의 생존능 증가 효과, 카드뮴에 대한 세포 독성 저해효과, 활성산소 중의 억제효과 및 중금속에 대한 세포독성을 억제하는 유전자의 발현의 증가효과를 나타내 는바, 카드뮴중독 관련 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<57> 이하, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<58> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<59> 실시예 1. 장생도라지 조추출물의 제조

<60> (주)장생도라지로부터 구입한 장생도라지 지하부를 수분의 함량이 5 % 이하가 되도록 건조하고 이를 분쇄한 후, 장생도라지 분말 0.5kg에 증류수 4ℓ를 가하고 90 내지 95 ℃에서 5시간동안 2회 추출한 후 여과하고 이를 동결 건조하여 장생도라지 열수 추출물 199 g를 수득 (수득율 : 39.8%) 하였다.

<61> 실시예 2. 장생도라지 조추출물로부터 정제 분획물의 분리

<62> 상기 실시예 1에서 수득한 장생도라지 열수 추출물 100 g을 증류수에 녹여 여과한 여액을 HP-20(diaion) 컬럼에 통과시켰다. 이때 당 성분을 제외한 HP-20 컬럼에 흡착된 유기물 성분들을 당 성분이 용출되지 않을 때까지 충분히 물로 씻어준 후 나머지는 100 % 메탄올로 탈착시켜 물과 메탄올에 용해되는 성분으로 각각 분리하였다. 메탄올에 용출된 성분들은 메탄올을 감압농축 시키고 나머지를 다시 소량의 메탄올에 녹여 충분히 저어주면서 에틸에테르를 가하여 침전이 형성되도록 하고 이를 여과하고 건조시켜 플라티코딘 A(platycodin A), 플라티코딘 C(platycodin C), 플라티코딘 D(platycodin D), 폴리갈락신 D(polygalacin D), 디아피오플라티코딘 D(deapioplatycodin D), 플라티코시드 E(platycoside E)를 함유한 조사포닌 분획물 (CKS, 약 2.3 g)을 얻어 이를 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

<63> 실험예 1. 인간 간세포 HepG2 준비

<64> 인체 간세포주인 HepG2 세포주는 한국세포주은행(88065)에서 구입하였고, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; M2003], DMEM 배양액(D5796), Trypsin, Fetal bovine serum(F2442)은 시그마사 (Sigma chemical Co)에서 구입하였다.

<65> 실험예 2. 조사포닌 분획물(CKS)에 의한 카드뮴 독성에 대한 세포 생존능 증가 효과

<66> 상기 실시예에서 얻은 장생도라지 정제분획물의 세포 생존능 효과를 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (Kyung Jin Lee, Chul Yung Choi, Young Chul Chung, Young Sup Kim, Si Yung Ryu, Seong Hwan Roh and Hye Gwang Jeong., *Toxicology Letters*, 147, p271, 2004).

<67> 세포독성 분석을 위해 48-웰 마이크로티터 플레이트(48-well microtiter plate)에 세포농도 5×10^6 cells/ml로 조절하여 300 μ ℓ씩 희석하여 세포를 분주한 후 장생도라지 조사포닌 분획물(CKS)을 12시간 전처리 하고 카드뮴 처리한 후 하루 동안 배양한 후 100 μ ℓ의 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]를 첨가하고 4시간 반응시켜 포르마잔(formazan)을 형성시킨 후, 상등액을 제거하고 DMSO 100 μ ℓ/well을 가하여 포르마잔을 녹인 다음 ELISA reader(Variokan, Thermo Electron)를 이용하여 550 nm 파장에서 측정한 결과, 도 1에서 나타내는 바와 같이 조사포닌 분획물(CKS)의 농도 의존적으로 세포의 생존능이 증가함을 확인하였다.

<68> 실험예 3. 조사포닌 분획물(CKS)에 의해 카드뮴 독성에 대한 세포 독성 감소 측정

<69> 상기 실시예에서 얻은 장생도라지 정제분획물의 카드뮴 독성에 대한 세포독성감소 효과를 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (Kyung Jin Lee, Chul Yung Choi, Young Chul Chung, Young Sup Kim, Si Yung Ryu, Seong Hwan Roh and Hye Gwang Jeong., *Toxicology Letters*, 147, p271, 2004).

<70> HepG2 세포를 96 웰 플레이트에 1×10^4 cells/well 되도록 분주하여 24시간 배양한 후 시료(CKS 2, 4 μ g/ml)를 12시간 전처리하고 카드뮴(CdCl_2 20 μ M) 처리한 후 하루 동안 배양한 후 24 시간 배양하였으며, 배지내의 LDH 활성을 측정하고자 기질 피루브산(pyruvate)이 락테이트(lactate)로 감소되는 정도를 조사하여 LDH 활성을 측정하였다. 0.1 M 칼륨완충용액(potassium phosphate buffer-pH 7.5) 2.7 ml을 큐벳(cuvette)에 넣고 0.1ml 배양배지를 첨가하고, 0.02 M 소듐 피루브산(sodium pyruvate) 0.1 ml을 넣은 후, NADH (0.2 mg) 0.1 ml을 첨가하여 잘 섞어준 후 340 nm 흡광도에서 2분 동안 흡광도를 측정하였다. LDH 활성의 감소는 환원된 NADH가 산화되고, 340 nm에서 최대 흡광도를 나타낸다.

<71> 실험 결과, 도 2에서 보이는 바와 같이, 장생도라지 사포닌 분획물물(CKS)에 의해 농도 의존적으로 카드뮴으로 증가된 세포 독성이 줄어드는 것을 확인 하였다.

<72> 실험예 4. 조사포닌 분획물(CKS)에 의해 카드뮴 독성으로 증가된 활성산소 종의 억제효과

<73> 상기 실시예에서 얻은 장생도라지 정제분획물의 카드뮴에 의해 증가된 활성산소의 감소효과를 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (Ji Young Kim, Dong Hee Kim, Hyung Gyun Kim, Gyu-Yong Song, Young Chul Chung, Seong Hwan Roh, Hye Gwang Jeong, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 210, p150, 2006).

<74> 세포독성 분석을 위해 48-well에 2×10^5 cells/ml 이 되도록 희석하여 HepG2 세포를 분주한 후 시료(CKS 2, 4 μ g/ml)를 12시간 전처리하고 세포주 내 Reactive oxygen species(ROS)를 측정하기 위해 CM-DCFDA(5-(and-6)-chloromeyhl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) 5 μ M을 30분 전처리한 다음 카드뮴을 처리(CdCl_2 20 μ M)한 후 시간대 별로 형광측정기(em : 488nm, ex: 530nm; Variokan, Thermo Electron)를 이용하여 변화하는 세포 내 ROS양을 측정하였다.

<75> 실험결과, 도 3에서 나타나는 바와 같이 카드뮴에 의해 증가된 활성 산소가 장생도라지 조사포닌 분획물(CKS)에 의해 농도의존적으로 줄어드는 것을 확인하였다.

<76> 실험예 5. 조사포닌 분획물(CKS)에 의해 MT유전자의 발현 증가 측정

<77> 상기 실시예에서 얻은 장생도라지 정제분획물의 MT유전자의 발현을 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (Ji Young Kim, Dong Hee Kim, Hyung Gyun Kim, Gyu-Yong Song, Young Chul Chung, Seong Hwan Roh and Hye Gwang Jeong., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 210, p150, 2006).

<78> 100 mm dish에 2×10^5 cell/ml로 세포를 분주한 뒤, 24시간 후에 장생도라지 조사포닌 정제분획물(CKS)을 처리하고, 12시간 후에 HepG2 세포를 4M 단백질변성제(guanidine thiocyanate)에 용해시키거나 RNAzol 용액을 이용하여 전체 세포내 RNA를 분리한 다음, 이로부터 분리한 mRNA 0.1 μ g을 0.5 μ g oligo d(T)₁₈ 프라이머(primer)와 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하고 합성한 cDNA를 이용하여 MT의 발현을 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 그리고 정량적 분석을 위하여 합성한 cDNA를 주형으로(template) 하여 준정량적(semiquantitative) PCR을 이용한 방법을 개발하여 증폭된 PCR산물은 MT는 200bp, GAPDH는 983bp에서 2% 아가로스 젤(agarose gel)을 이용하여 분리 및 확인하였다.

<79> 실험결과, 장생도라지 조사포닌 분획물(CKS)을 처리 후 증금속에 대한 세포 독성을 억제할 수 있는 유전자중 MT1A의 발현을 조사한 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 농도 의존적으로 유전자발현이 증가함을 확인하였다.

<80>

<81> 하기에 본 발명의 정제분획물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<82> 제제예 1. 산제의 제조

<83>	실시예 1의 CKS	20 mg
<84>	유당	100 mg
<85>	탈크	10 mg

<86> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

<87> **제제예 2. 정제의 제조**

<88>	실시에 2의 CKS	10 mg
<89>	옥수수전분	100 mg
<90>	유당	100 mg
<91>	스테아린산 마그네슘	2 mg

<92> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<93> **제제예 3. 캡셀제의 제조**

<94>	실시에 1의 CKS	10 mg
<95>	결정성 셀룰로오스	3 mg
<96>	락토오스	14.8 mg
<97>	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

<98> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<99> **제제예 4. 주사제의 제조**

<100>	실시에 2의 CKS	10 mg
<101>	만니톨	180 mg
<102>	주사용 멸균 증류수	2974 mg
<103>	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	26 mg

<104> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<105> **제제예 5. 액제의 제조**

<106>	실시에 1의 CKS	20 mg
<107>	이성화당	10 g
<108>	만니톨	5 g
<109>	정제수	적량

<110> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<111> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<112>	실시에 1의 CKS	1000 mg
<113>	비타민 혼합물	적량
<114>	비타민 A 아세테이트	70 μg
<115>	비타민 E	1.0 mg
<116>	비타민 B1	0.13 mg
<117>	비타민 B2	0.15 mg
<118>	비타민 B6	0.5 mg
<119>	비타민 B12	0.2 μg

<120>	비타민 C	10 mg
<121>	비오틴	10 μ g
<122>	니코틴산아미드	1.7 mg
<123>	엽산	50 μ g
<124>	판토텐산 칼슘	0.5 mg
<125>	무기질 혼합물	적량
<126>	황산제1철	1.75 mg
<127>	산화아연	0.82 mg
<128>	탄산마그네슘	25.3 mg
<129>	제1인산칼륨	15 mg
<130>	제2인산칼륨	55 mg
<131>	구연산칼륨	90 mg
<132>	탄산칼슘	100 mg
<133>	염화마그네슘	24.8 mg

<134> 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

<135> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<136>	실시예 1의 CKS	1000 mg
<137>	구연산	1000 mg
<138>	올리고당	100 g
<139>	매실농축액	2 g
<140>	타우린	1 g
<141>	정제수를 가하여	전체 900 ml

<142> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

<143> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면의 간단한 설명

<144> 도 1은 장생도라지 조사포닌 정제분획물(CKS)의 카드뮴 독성에 대한 세포 생존능 증가 효과를 나타낸 도이고,

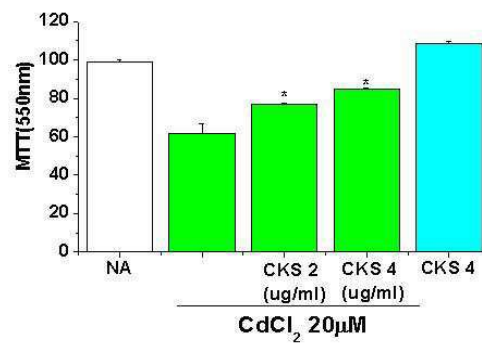
<145> 도 2는 장생도라지 조사포닌 정제분획물(CKS)의 카드뮴 독성에 대한 세포 독성 억제 활성을 측정한 도이며,

<146> 도 3은 장생도라지 조사포닌 정제분획물(CKS)의 카드뮴 독성에 의해 증가된 활성산소 종의 억제 효과를 나타낸 도이고,

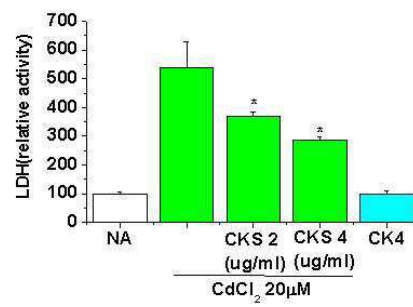
<147> 도 4는 장생도라지 조사포닌 정제분획물(CKS)의 metallothionein 1A(MT1A)의 발현 효과를 나타낸 도이다.

도면

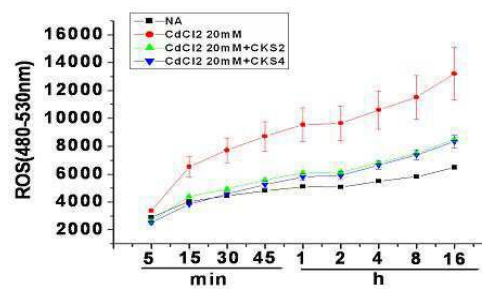
도면1



도면2



도면3



도면4

