



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0057200
(43) 공개일자 2017년05월24일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 36/8962</i> (2006.01) <i>A23L 33/105</i> (2016.01)
 <i>A61K 31/352</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 36/8962</i> (2013.01)
 <i>A23L 33/105</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0059073(분할)
 (22) 출원일자 2017년05월12일
 심사청구일자 2017년05월12일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2015-0145269
 원출원일자 2015년10월19일
 심사청구일자 2015년10월19일</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 강동호
 서울특별시 마포구 광성로6길 16 (신수동)
 홍빛나
 경기도 성남시 분당구 판교원로82번길 30, 1304동 901호 (운중동, 산운마을13단지아파트)
 허유리
 충청북도 충주시 봉계13길 26-1, 201호 (봉방동)</p> <p>(74) 대리인
 안소영</p> |
|---|---|

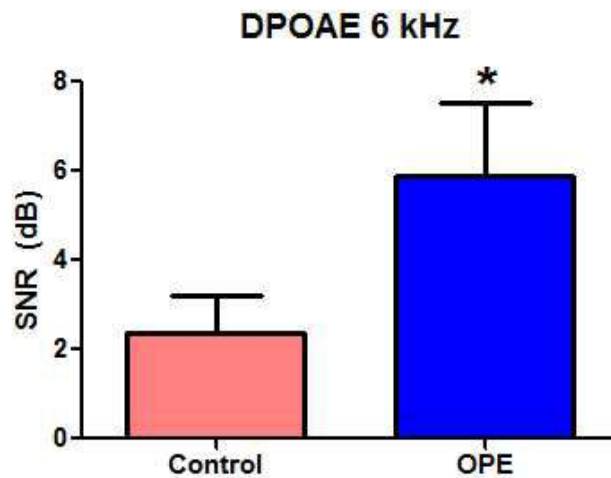
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **난청의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 양파 껍질 추출물 또는 퀘르세틴을 포함하는, 난청의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

양파 껍질(*Allium cepa* peel) 추출물을 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 난청이 소음성 난청(noise-induced hearing loss)인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 양파 껍질 추출물은 양파 껍질을 물, $C_1 \sim C_4$ 의 알콜, 및 물과 $C_1 \sim C_4$ 의 알콜과의 혼합용매로 이루어진 균으로부터 선택된 용매로 추출하여 제조된 것인 약학적 조성물.

청구항 4

양파 껍질(*Allium cepa* peel) 추출물을 포함하는 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 난청이 소음성 난청(noise-induced hearing loss)인 식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 양파 껍질 추출물은 양파 껍질을 물, $C_1 \sim C_4$ 의 알콜, 및 물과 $C_1 \sim C_4$ 의 알콜과의 혼합용매로 이루어진 균으로부터 선택된 용매로 추출하여 제조된 것인 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 양파 껍질 추출물 또는 퀘르세틴을 포함하는, 난청의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 귀는 귓바퀴와 외이도까지를 외이로 분류하고, 고막과 이소골은 중이, 그리고 달팽이관과 청신경을 내이로 분류한다. 소리는 음향학적 에너지로서 귓바퀴와 외이도를 통해 전달되어 고막을 진동시키게 된다. 고막의 진동은 기계적인 에너지로 고막에 붙어있는 3개의 작은 뼈로 이루어진 이소골로 전달된다. 이소골의 마지막 뼈인 등골은 달팽이관에 연결되어, 달팽이관 내의 림프액으로 에너지를 전달시키게 된다. 전달된 에너지는 림프액에 파동을 일으키고 이러한 파동에 의해 달팽이관 내에 있는 유모세포가 자극받게 된다. 유모세포의 움직임으로 이온변화가 일어나면서 유모세포에 붙어있는 청신경으로 신경전달물질이 전달되고, 소리에너지는 청신경에서 전기적인 에너지 형태로 뇌까지 전달되게 된다. 외이와 중이는 소리를 전달하는 기관으로서 염증 같은 질병에 감염되었을 때 대부분 치료나 수술로써 회복될 수 있고, 그로 인한 청력손실 역시 치료 후에 개선될 수 있다. 이러한 난청을 전음성 난청(conductive hearing loss)이라 한다. 소리를 감지하는 기관인 달팽이관과 전기적 에너지로 소리를 전달하는 청신경, 그리고 소리의 변별, 이해 등 종합적인 역할을 하는 청각을 담당하는 뇌에 문제가 생겨 발생하는 난청을 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)이라 한다.

[0003] 대부분의 청력손실은 현재까지 예방 외에 치료방법이 없는 감각신경성 난청에 해당하며, 일단 난청이 발병되면 보청기 등의 보조수단을 이용하거나 아니면 기계적 장치를 체내에 이식하는 방법으로 도움을 받고 있다. 감각신경성 난청의 원인으로는 소음, 약물, 노화, 외상, 대사성질환, 바이러스 등이 있다. 이 중 최근 눈에 띄게 증가하는 인자는 소음과 노화로 인한 난청이다. 전세계적인 추세인 사회의 고령화는 노인성 난청을 증가시키고 있고, 소음환경에서 일하는 근로자나 군인 같은 직업적 소음성 난청뿐만 아니라 문화 및 여가생활에 의한 소음

성 난청도 증가하고 있다.

[0004] 최근, 난청의 예방 및 치료에 효과적인 물질을 찾기 위한 연구로서, 항산화제, N-메틸-D-아스파테이트 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 길항제, 세포사멸 억제제, 성장인자 등에 대한 전임상 연구가 보고되고 있으나, 임상실험으로 진행하기에는 한계가 있음이 나타났다(Prasher D., *Lancet*, 352, pp1240-1242, 1998). 현재까지 소음성 난청의 예방 및 치료와 관련하여 승인된 약물은 없으며, 학계에 보고된 바로는 전임상 단계에서의 연구와 임상 단계에서의 Mg, NAC (N-acetylcysteine, NAC) 그리고 엽셀렌(Ebselen)의 약물만이 보고되어 있다(Meister A., *Pharmacol. Ther.*, 51, pp155-194, 1991; Attias J. et al., *Am. J. Otolaryngol.*, 15, pp26-32, 1994; Yamasoba T. et al., *Neurosci. Lett.*, 380, pp234-238, 2005).

[0005] 이러한 배경 하, 본 발명자들은 안전성이 우수한 천연물을 대상으로 난청을 예방하거나 치료할 수 있는 다양한 활성물질들을 검색한 결과, 놀랍게도 양파 껍질 추출물 및 퀘르세틴이 소음으로 인한 청력 역치의 상승을 효과적으로 억제하는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 양파 껍질(*Allium cepa* peel) 추출물 또는 퀘르세틴(quercetin)을 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 양파 껍질(*Allium cepa* peel) 추출물 또는 퀘르세틴(quercetin)을 포함하는 난청의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 양파 껍질(*Allium cepa* peel) 추출물 또는 퀘르세틴(quercetin)을 포함하는 난청의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명에 따른 약학 조성물은 전음성 난청 및 감각신경성 난청을 포함하는 난청의 예방 또는 치료에 효과적이며, 특히, 음향의상성 난청, 단시간의 소음으로 인한 일시적 역치 상승 및 장시간의 소음으로 인한 영구적 역치 상승을 포함하는 소음성 난청의 예방 또는 치료에 효과적이다.

[0010] 본 발명에서 사용된 용어, "양파"는 학명 *Allium cepa*로 지칭되는 백합과의 식물을 의미하며 "양파 껍질"은 상기 양파의 껍질을 의미한다.

[0011] 본 발명의 목적상 상기 양파 껍질, 양파 껍질 추출물 및 퀘르세틴은 난청의 예방 또는 치료용으로 사용된다.

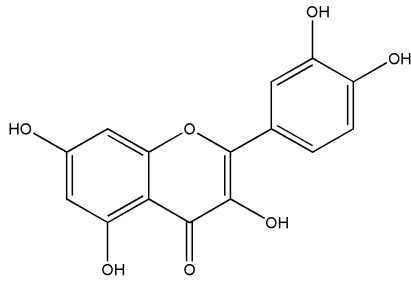
[0012] 본 발명에서 양파 또는 양파 껍질은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 본 발명에서 사용된 용어, "추출물"이란 양파 껍질로부터 분리하여 얻은 물질을 의미하며, 구체적으로는 물, C₁-₄ 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 부탄올 등), 또는 상기 알코올과 물과의 혼합용매 등의 추출용매를 사용하여 분리하여 얻은 물질을 의미한다. 바람직하게 본 발명의 양파 껍질 추출물은 양파 껍질의 에탄올 추출물이다.

[0014] 구체적으로, 본 발명에 따른 상기 양파 껍질 추출물은 양파 껍질 무게에 대하여 약 1 내지 20 배, 바람직하게는 약 3 내지 10 배의 상기 추출용매, 바람직하게는 물과 에탄올의 혼합용매로 추출함으로써 제조할 수 있다.

[0015] 상기 혼합용매는 바람직하게는 약 70 % 에탄올 수용액을 사용할 수 있다. 추출은 당 분야에 알려진 추출방법, 예컨대, 냉침, 열수추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출 등의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 추출 온도는 당업자가 추출 방법에 적절한 다양한 온도 범위를 채택할 수 있으며, 예를 들어, 20 ℃ 내지 100 ℃ 등에서 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 또한, 추출시간은 추출방법에 따라 상이하며, 당업자가 적절한 추출시간을 채택할 수 있으며, 이에 국한되지 않으나, 약 1 시간 내지 10 일의 범위에서 단회 또는 복수회로 수행될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출은 실온에서 약 2 일씩 2~3회 상기한 추출용매로 추출함으로써 수행될 수 있다.

[0016] 본 발명에서 용어, "퀘르세틴"은 하기 화학식으로 표시되는 화합물을 의미한다:



[0017]

[0018] 상기 퀘르세틴은 플라보놀의 일종으로 적포도주, 양파, 특히 양파껍질, 녹차, 사과, 베리 등에 풍부한 것으로 알려져 있으며, 항산화작용 및 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0019] 상기 퀘르세틴은 천연물(예를 들어 양파 껍질)로부터 분리하거나, 또는 상업적으로 구매하여 사용하거나, 또는 공지된 방법으로 당업자가 합성하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 용어, "난청(hearing loss)"은 외이, 중이 및 신경전달경로 중 어느 부분의 이상으로 청력이 감소된 상태를 말하며, 전음성 난청(conductive hearing loss) 및 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)을 포함한다. 바람직하게 본 발명에서 난청은 소음, 약물, 노화, 외상, 바이러스 등의 다양한 원인에 의해 발생하는 전음성 난청 및 다양한 소음에 의해 달팽이관과 청신경이 손상된 증상을 나타내는 소음성 난청(Noise induced hearing loss, NIHL)을 포함하는 감각신경성 난청을 포함한다.

[0021] 상기 소음성 난청은 음향외상성 난청(Acoustic Trauma Hearing loss), 단시간의 소음으로 인한 일시적 역치 상승(Temporary threshold shift, TTS) 및 장시간의 소음으로 인한 영구적 역치 상승(Permanent threshold shift, PTS)을 모두 포함한다.

[0022] 본 발명의 상기 양파 껍질 추출물 또는 퀘르세틴은 소음 등으로 인한 청력 역치의 상승을 효과적으로 억제시킴으로써, 난청, 특히 음향 외상성, 일시적 또는 영구적 소음성 난청을 억제할 수 있다.

[0023] 구체적인 일 실험예에서 양파 껍질 추출물을 마우스에 투여하여 이음향방사 측정을 수행하였고, 그 결과 양파 껍질 추출물이 소음에 노출된 달팽이관 내 유모세포의 손상을 개선하는 것을 확인할 수 있었다(도 1). 또한, 양파 껍질 추출물의 청력 개선 효과를 확인하기 위하여 마우스를 대상으로 청성유발전위 측정을 수행하였고, 그 결과 클릭음과 Tone burst 자극음 모두에서 청력역치가 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다(도 2 및 3). 또한, Na-Pa 진폭으로 중기반응 검사를 수행한 결과, 양파 껍질 추출물이 청각 중추 손상을 개선함을 확인할 수 있었다(도 4).

[0024] 또한, 구체적인 다른 실험예에서, 퀘르세틴의 청력 개선 효과를 확인하기 위하여 마우스를 대상으로 청성유발전위 측정을 수행하였고, 그 결과 클릭음과 Tone burst 자극음 모두에서 청력역치가 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다(도 5 내지 7). 또한, 퀘르세틴을 제브라피쉬에 처리하고, 네오마이신 유도성 유모세포의 손상에 대한 개선효과를 확인한 결과, 손상으로 감소한 신경소구 및 유모세포의 수를 현저하게 증가시킴을 확인할 수 있었다(도 9).

[0025] 상기와 같이 본 발명의 양파 껍질 추출물 또는 퀘르세틴은 청각 역치를 크게 감소시키고, 손상된 신경소구 및 유모세포의 개수를 현저히 증가시킴으로서, 청각 경로 손상을 완화시켜, 난청의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0026] 따라서 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 양파 껍질 추출물 또는 퀘르세틴을 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 인간을 포함하는 개체에게 투여하여 난청을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란 난청이 이미 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[0028] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고

종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다.
- [0030] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 당업계에서 통상적으로 사용되는 것들, 예컨대 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함한다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물이 경구용 고형 제제로 제제화된 경우 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토즈, 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물이 경구용 액상 제제화된 경우 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물이 비경구용 제제화된 경우 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 국한되지 않는다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물에 함유되는 양과 껍질 추출물 또는 퀘르세틴의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 양과 껍질 추출물은 1일 1 내지 2000 mg/kg으로, 바람직하게는 10 내지 2000 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 퀘르세틴은 1일 1 내지 2000 mg/kg으로, 바람직하게는 10 내지 2000 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있고, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0036] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 양과 껍질 추출물 또는 퀘르세틴을 포함하는 난청, 바람직하게 소음성 난청의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0037] 상기 양과, 양과 껍질 추출물, 퀘르세틴 및 난청은 앞서 설명한 바와 같다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 본 발명에서 용어 "건강기능식품"이라 함은 건강 기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0039] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0040] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0041] 본 발명의 식품 조성물은 난청, 특히 소음성 난청의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여

양과 껍질 추출물을 0.01 내지 95 중량%, 바람직하게는 1 내지 80 중량%, 퀘르세틴을 0.01 내지 95 중량%, 바람직하게는 1 내지 80 중량% 포함할 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 난청의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0043] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 양과 껍질 추출물 또는 퀘르세틴, 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.

[0044] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 통상의 경질캡셀에 양과 껍질 추출물 또는 퀘르세틴, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡셀제는 양과 껍질 추출물 또는 퀘르세틴 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0045] 환 형태의 건강기능식품은 양과 껍질 추출물 또는 퀘르세틴, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

[0046] 과립형태의 건강기능식품은 양과 껍질 추출물 또는 퀘르세틴, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μm), 14호 (1410 μm) 및 45호 (350 μm) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것이 전체량의 5.0 %이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하일 수 있다.

[0047] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다(대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).

발명의 효과

[0048] 본 발명에 따른 양과 껍질 추출물 또는 퀘르세틴은 소음 등으로 인한 유모세포의 손상을 보호하고, 청신경에서 측정되는 청력역치를 효과적으로 감소시켜 난청의 예방, 치료 및 개선제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 소음노출 후 이음향방사 측정시 양과 껍질 추출물의 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(control: 미처리 대조군, OPE: 양과 껍질 추출물 처리 실험군).

도 2는 소음노출 후 클릭 자극음에서 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정 시 양과 껍질 추출물의 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(control: 미처리 대조군, OPE: 양과 껍질 추출물 처리 실험군).

도 3은 소음노출 후 8 kHz TB 자극음에서 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정시 양과 껍질 추출물의 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(control: 미처리 대조군, OPE: 양과 껍질 추출물 처리 실험군).

도 4는 소음노출 후 중기반응을 이용한 Na-Pa 진폭 측정 시 양과 껍질 추출물의 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(control: 미처리 대조군, OPE: 양과 껍질 추출물 처리 실험군).

도 5는 소음노출 후 클릭 자극음에서 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정 시 퀘르세틴의 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(control: 미처리 대조군, Quercetin: 퀘르세틴 처리 실험군).

도 6은 소음노출 후 4 kHz TB 자극음에서 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정시 퀘르세틴의 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(control: 미처리 대조군, Quercetin: 퀘르세틴 처리 실험군).

도 7은 소음노출 후 8 kHz TB 자극음에서 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정시 퀘르세틴의 효과를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다(control: 미처리 대조군, Quercetin: 퀘르세틴 처리 실험군).

도 8은 네오마이신 처리 후 손상된 신경소구(neuromast) 수에 대한 개선 효과를 나타낸 그래프 및 형광이미지를

촬영한 사진이다(nor: 네오마이신 미처리 정상 대조군, con: 양파 껍질 추출물 미처리 대조군, OPE: 양파 껍질 추출물 처리 실험군).

도 9는 네오마이신 처리 후 손상된 신경소구(neuromast) 수에 대한 개선 효과를 나타낸 그래프 및 형광이미지를 촬영한 사진이다(nor: 네오마이신 미처리 정상 대조군, con: 퀘르세틴 미처리 대조군, Quercetin: 퀘르세틴 처리 실험군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] [실시예]

[0052] 실시예 1: 양파 껍질 추출물의 제조

[0053] 양파 껍질 500 g을 70% 에탄올 10 ℓ에 넣고, 추출용기에서 80℃에서 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 상층액을 모은 후, 45℃로 감압농축기(EYELA, N-N)로 농축한 후, ILSHIN 동결건조기로 -40℃이하의 온도로 12시간 이상 동결건조시켜 양파 껍질 추출물 30.04 g을 수득하였다.

[0054] [실험예]

[0055] 실험예 1: 동물

[0056] 1. 마우스

[0057] 육주령의 ICR 수컷 마우스를 Young Bio (성남, 한국)에서 구입하였다. 마우스는 음식과 물에 자유로운 접근이 가능하였고, 습한 환경, 일정 온도에서 12시간 낮, 12시간 밤의 사이클로 관리하였다. 사육장에 일주일 동안 적응시킨 후, 정상 청각을 확인하기 위하여 소음 노출 전에 실험동물의 청각 유발 전위검사(auditory evoked potential; AEPs)를 실시하였다. 정상 청각을 가진 마우스의 ABR 역치 수준은 25 dB이었다.

[0058] 2. 제브라피쉬

[0059] 야생형 성어 제브라피쉬(Danio rerio)를 제브라피쉬 시스템 S 타입(1500(W)×400(D)×2050(H) mm, 대전, 한국)에서 유지시켰다. 세 쌍의 제브라피쉬를 하룻밤 동안 산란 박스에 두었고, 다음 날 제브라피쉬들이 30-60분의 빛 주기 후에 산란하기 시작하였다. 수정 후 3시간 뒤 제브라피쉬 알을 수집하였고 0.03% 바다 소금 용액 중 페트리디쉬에서 인큐베이션하였다. 배아는 14시간 빛, 10시간 어둠의 사이클로 28℃에서 인큐베이터에 유지시켰다. 실험에 사용한 제브라피쉬는 수정 후 5일째를 사용하였다.

[0060] 실험예 2. 소음노출 후 양파 껍질 추출물의 유모세포 보호 효과 확인-이음향방사(otoacoustic emission, OAE) 측정법

[0061] 소음 노출 후 달팽이관 내의 유모세포(hair cell of cochlea) 손상에 있어서 양파 껍질 추출물의 효과를 확인하기 위해 이음향방사 측정 실험을 수행하였다.

[0062] 이음향방사(Transient evoked otoacoustic emission, TEOAE) 측정법은 달팽이관 내의 유모세포에서 발생하는 소리를 외부에서 측정하는 방법으로, 건강한 유모세포의 경우 소리자극에 대한 반응으로써 소리를 발생시킨다. 반면 손상된 유모세포에서는 이러한 반응이 작아지거나 사라지게 된다. 소음성 자극은 달팽이관 내의 유모세포에 심각한 손상을 미치기 때문에 소음성 난청에 대한 양파 껍질 추출물의 효과를 확인하기 위해 이음향방사 측정을 수행하였다.

[0063] 실시예 1에서 제조한 양파 껍질 추출물 100 mg/kg을 투여할 마우스와 아무것도 처리하지 않은(미처리) 대조군 마우스를 각각 8마리씩 두 그룹으로 나누어 평가하였다. 소음은 120 dB 광대역 소음으로 2시간 동안 노출시켰으며, 소음 노출 24시간 후부터 매일 같은 시간에 경구투여했다. 이음향방사 측정은 양파 껍질 추출물 투여 21일째 평가하였다. 이음향방사 측정을 위하여 마우스는 케타민(4.57 mg/kg)과 실라진(0.43 mg/kg)을 투여하여 마취시킨 뒤 체온 37±0.5 ℃를 유지시키면서 평가하였다. 이음향방사 측정 시 자극음은 90 dB로 했으며 검사 주파수는 6 kHz로 하였다.

[0064] 그 결과, 도 1에서 확인되는 바와 같이, 양파 껍질 추출물(OPE) 그룹이 대조군보다 OAE 반응이 유의적으로 높게 나타나 양파 껍질 추출물 (OPE)의 투여가 소음 노출 후 유모세포의 손상을 개선시키는 것으로 나타났다.

[0065] 실험예 3: 소음노출 후 양과 꺾질 추출물의 청력 개선 효과 확인 - 클릭(click) 자극음 사용

[0066] 소음 노출 후 청력역치를 측정하여 소리의 유무에 대한 감각에 있어서 양과 꺾질 추출물의 효과를 확인하기 위해 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정 실험을 수행하였다.

[0067] 청성유발전위(auditory brainstem response, ABR) 측정법은 소리자극이 청신경에서 전기적인 신호로 전달될 때, 상기 전기적인 에너지를 측정하여 소리에 대한 반응을 평가하는 방법이다. 소리가 외이와 중이 그리고 달팽이관을 거쳐 청신경에 도달했을 때의 반응은 외이, 중이, 달팽이관의 상태를 모두 반영하는 것으로 이는 뇌까지 소리 에너지가 도달하는 실제적인 소리 에너지를 반영하는 것이다. 청력역치라 함은 겨우 들을 수 있는 소리의 최소 감각지점을 말하는 것으로 정상 마우스의 경우 평균적으로 20 dB의 작은 소리에서도 반응이 관찰된다.

[0068] 실시예 1에서 제조한 양과 꺾질 추출물 100 mg/kg 투여할 마우스와 미처리 대조군 마우스를 각각 8마리씩 두 그룹으로 나누어 평가하였다. 소음은 120 dB 4 KHz 순음으로 2시간 동안 노출시켰으며, 양과 꺾질 추출물은 소음 노출 24시간 후부터 매일 같은 시간에 경구투여 했다. 청력역치는 양과 꺾질 투여 21일째에 평가하였다. 청성유발전위 검사를 위하여 케타민(4.57 mg/kg)과 실라진(0.43 mg/kg)을 마우스에게 근육 주사하여 마취시킨 뒤 체온 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지시키면서 평가하였다. 청성유발전위 검사시 자극음은 광대역 자극음인 클릭(click)음으로 90 dB부터 점차적으로 5 dB씩 소리를 낮춰가며 평가했으며 반응이 나오는 가장 작은 소리를 역치로 하였다.

[0069] 도 2에서 확인되는 바와 같이, 대조군에 비해 양과 꺾질 추출물(OPE)을 투여한 그룹의 청력역치가 유의미하게 감소하였다. 이러한 결과는 양과 꺾질 추출물(OPE)이 소음성 난청 예방 및 치료에 효과가 있음을 보여주는 것으로 확인되었다.

[0070] 실험예 4: 소음노출 후 양과 꺾질 추출물의 청력 개선 효과 확인 - 8 kHz TB 자극음 사용

[0071] 소음 노출 후 청력역치를 8 kHz 자극음으로 측정하여 양과 꺾질 추출물의 청력 개선 효과를 확인하기 위해 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정 실험을 수행하였다.

[0072] 청성유발전위 검사시 자극음은 8 kHz TB로 70 dB부터 점차적으로 5 dB씩 소리를 낮춰가며 평가한 것을 제외하고는 실험예 3과 동일하게 실험을 수행하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0073] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 양과 꺾질 추출물(OPE) 투여 그룹의 경우 대조군에 비해 청력 역치가 감소하는 것으로 나타났다. 클릭 자극음을 사용했을 때의 검사 결과와 마찬가지로 양과 꺾질 추출물(OPE)을 투여한 그룹의 경우 청력역치가 개선 효과가 높게 나타나 양과 꺾질 추출물(OPE)이 소음성 난청 예방 및 치료에 효과가 있음을 보여주는 것으로 확인되었다.

[0074] 실험예 5: 소음노출 후 중기반응 진폭 분석을 통한 양과 꺾질 추출물의 청력 개선 효과 확인

[0075] 본 시험은 소음 노출 후 전기생리학적 평가 시 중기반응 검사 결과에서 Na-Pa의 진폭(amplitude)을 측정하여 양과 꺾질 추출물의 소음성 난청 치료 효과를 비교하기 위해 수행하였다.

[0076] 중기반응(Auditory Middle Latency Response, AMLR) 검사는 소리자극 후 20~30 ms 사이에 나타나는 반응으로 positive 반응의 꼭지점을 Pa라 명하고, 반응전 negative 지점은 Na라 명한다. 청력 손상이 있는 경우 Na-Pa 사이의 진폭이 낮아지는 경향을 보인다. 중기반응은 청각영역의 중뇌 근처로써 청각의 중추기능을 평가하는 방법이다.

[0077] 실시예 1에서 제조한 양과 꺾질 추출물 100 mg/kg 투여할 마우스와 미처리 대조군 마우스를 각각 8마리씩 두 그룹으로 나누어 평가하였다. 소음은 120 dB 4 KHz 순음으로 2시간 동안 노출시켰으며, 양과 꺾질 추출물을 소음 노출 24시간 후부터 매일 같은 시간에 경구투여 했다. 중기반응 검사는 양과 꺾질 추출물 투여 후 21일째 평가하였다. 중기반응 검사를 위하여 케타민(4.57 mg/kg)과 실라진(0.43 mg/kg)을 마우스에게 근육 주사하여 마취시킨 뒤 체온 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지시키면서 평가하였다. 중기반응 검사시 자극음은 클릭(click)으로 90 dB에서 평가했다.

[0078] 도 4에서 확인되는 바와 같이, 대조군(control)은 소음 노출 후 진폭이 낮아져 소음으로 인한 손상이 있음을 확인하였고, 양과 꺾질 추출물(OPE) 투여 그룹은 대조군보다 유의적으로 진폭이 높아졌다. 본 실험 결과는 양과 꺾질 추출물(OPE)이 소음으로 인한 청각 중추 손상에 개선 효과가 있음을 보여주는 결과이다.

[0079] 실험예 6: 소음노출 후 퀘르세틴의 청력 개선 효과 확인 - 클릭(click) 자극음 사용

[0080] 퀘르세틴 10 mg/kg을 투여할 마우스와 미처리 대조군 마우스를 각각 8마리씩 두 그룹으로 나누어 평가하였다.

소음은 120 dB 4 KHz 순음으로 2시간 동안 노출시켰으며, 퀘르세틴은 소음 노출 24시간 후부터 매일 같은 시간에 경구투여 했다. 청력역치는 양파 껍질 투여 21일째에 평가하였다. 청성유발전위 검사를 위하여 케타민(4.57 mg/kg)과 실라진(0.43 mg/kg)을 마우스에게 근육 주사하여 마취시킨 뒤 체온 37 ± 0.5 °C를 유지시키면서 평가하였다. 청성유발전위 검사시 자극음은 광대역 자극음인 클릭(click)음으로 90 dB부터 점차적으로 5 dB씩 소리를 낮춰가며 평가했으며 반응이 나오는 가장 작은 소리를 역치로 하였다.

[0081] 그 결과 도 5에서 확인되는 바와 같이, 대조군에 비해 퀘르세틴을 투여한 그룹의 청력역치가 유의미하게 감소하였다. 이러한 결과는 퀘르세틴이 소음성 난청 예방 및 치료에 효과가 있음을 증명한다.

[0082] **실험예 7: 소음노출 후 퀘르세틴의 청력 개선 효과 확인 - 4 kHz TB (Tone burst) 자극음 사용**

[0083] 소음 노출 후 청력역치를 4 kHz 자극음으로 측정하여 퀘르세틴의 청력 개선 효과를 확인하기 위해 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정 실험을 수행하였다.

[0084] 청성유발전위 검사시 자극음은 4 kHz TB (Tone burst)로 70 dB부터 점차적으로 5 dB씩 소리를 낮춰가며 평가한 것을 제외하고는 실험예 6과 동일하게 실험을 수행하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0085] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 퀘르세틴 투여 그룹의 경우 대조군에 비해 청력 역치가 감소하는 것으로 나타났다. 클릭 자극음을 사용했을 때의 검사 결과와 마찬가지로 퀘르세틴을 투여한 그룹의 경우 청력역치가 개선 효과가 높게 나타나 퀘르세틴이 소음성 난청 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0086] **실험예 8: 소음노출 후 퀘르세틴의 청력 개선 효과 확인 - 8 kHz TB (Tone burst) 자극음 사용**

[0087] 소음 노출 후 청력역치를 8 kHz 자극음으로 측정하여 퀘르세틴의 청력 개선 효과를 확인하기 위해 청성유발전위를 이용한 청력역치 측정 실험을 수행하였다.

[0088] 청성유발전위 검사시 자극음은 8 kHz TB (Tone burst)로 70 dB부터 점차적으로 5 dB씩 소리를 낮춰가며 평가한 것을 제외하고는 실험예 6과 동일하게 실험을 수행하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0089] 도 7에서 확인되는 바와 같이, 퀘르세틴 투여 그룹의 경우 대조군에 비해 청력 역치가 감소하는 것으로 나타났다. 클릭 자극음을 사용했을 때의 검사 결과와 마찬가지로 퀘르세틴을 투여한 그룹의 경우 청력역치가 개선 효과가 높게 나타나 퀘르세틴이 소음성 난청 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

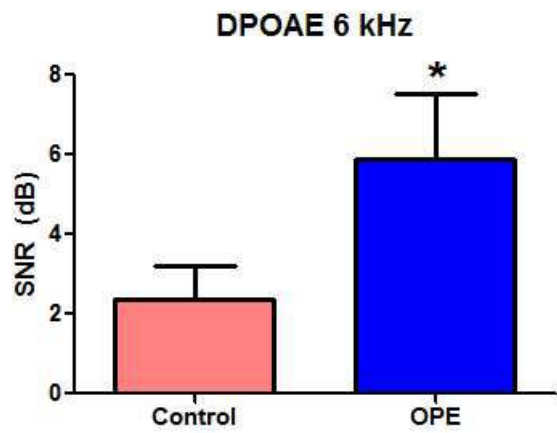
[0090] **실험예 9: 양파 껍질 추출물 및 퀘르세틴의 네오마이신(neomycin) 유도성 유모세포의 손상 개선에 대한 효과**

[0091] 야생형 제브라피쉬 유생을 96-웰 플레이트에 두고 1시간 동안 50 μ M의 네오마이신 술페이트로 처리하였다. 0.03% 바다 소금 용액으로 씻어낸 후, 제브라피쉬를 양파 껍질 추출물 10 및 20 μ g/mL, 퀘르세틴 5 및 10 μ M에 12시간 동안 28 °C에 노출시켰다. 양파 껍질 추출물 및 퀘르세틴 처리 12시간 후, 제브라피쉬의 유모세포를 0.1% YO-PRO1에 노출시켜 30분 동안 염색하였다. 제브라피쉬 유생을 0.02% 트리카인으로 마취시키고, 96-웰 플레이트에 두었다. 후면 축선의 신경소구 중 유모세포의 수 및 귀의 유모세포 손상을 형광현미경으로 관찰하였다. 모든 이미지는 Focus Lite 및 Image J software로 분석하였다.

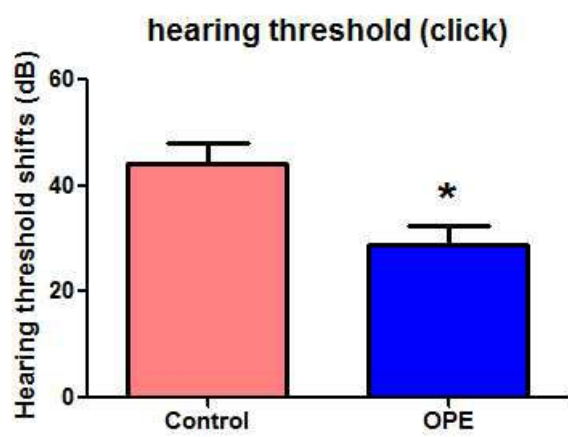
[0092] 그 결과, 도 8 및 9에 나타나듯이 양파 껍질 추출물(OPE) 및 퀘르세틴은 양파 껍질 추출물 또는 퀘르세틴을 처리하지 않은 대조군(con)과 비교하여 네오마이신으로 손상된 신경소구의 유모세포 수를 현저하게 증가시켰다.

도면

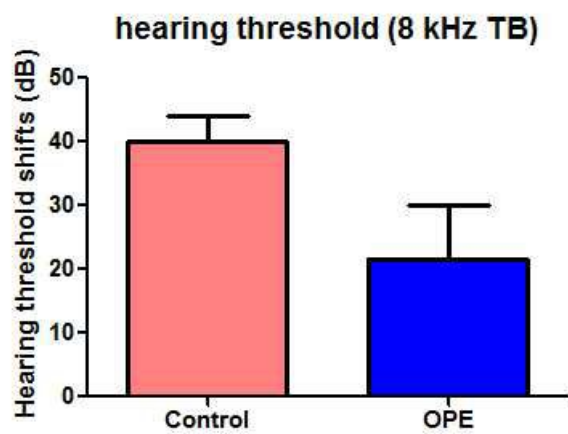
도면1



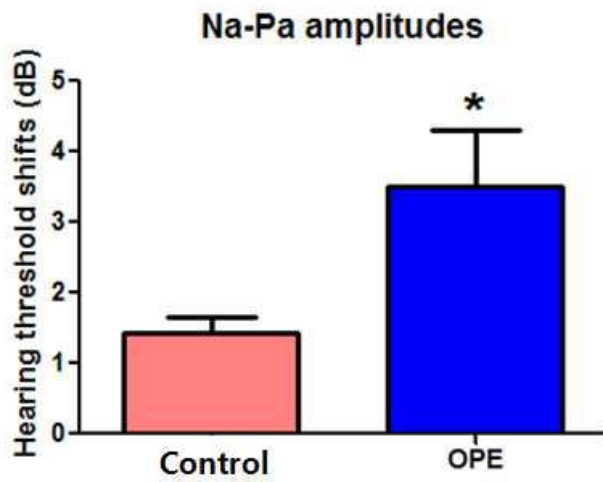
도면2



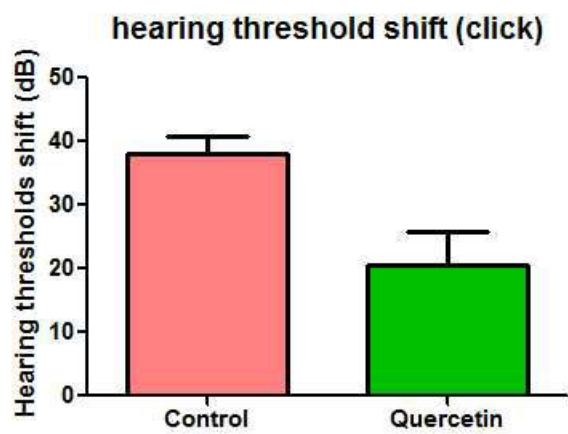
도면3



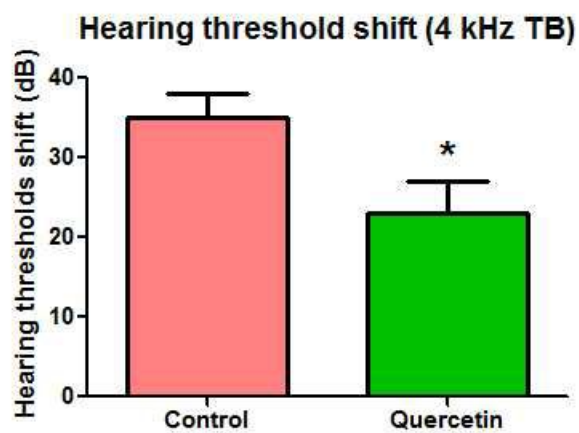
도면4



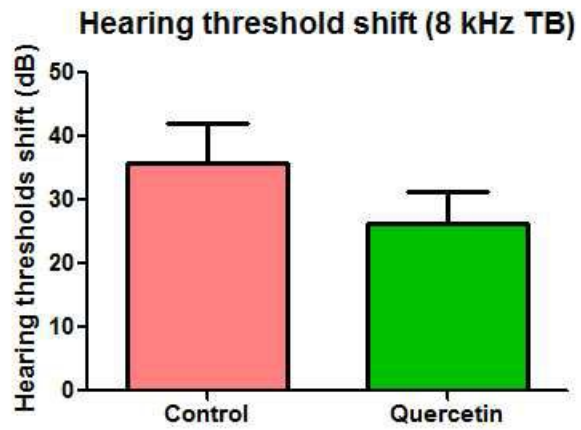
도면5



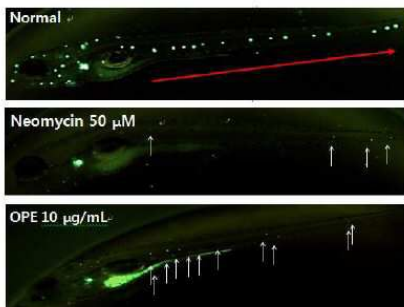
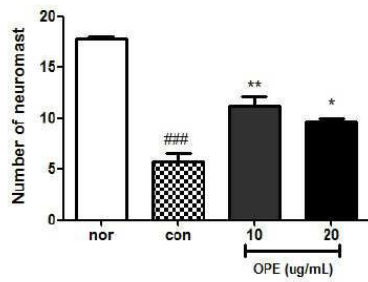
도면6



도면7



도면8



도면9

