(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년01월03일
(11) 등록번호 10-1692032
(24) 등록일자 2016년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/896 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/896 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0099240(분할)
(22) 출원일자 2016년08월04일
심사청구일자 2016년08월04일
(65) 공개번호 10-2016-0100279
(43) 공개일자 2016년08월23일
(62) 원출원 특허 10-2012-0108236
원출원일자 2012년09월27일
심사청구일자 2014년05월09일
(56) 선행기술조사문헌
신유진 외 3명. 얼레지 추출물의 ICR 마우스와 L1210 암세포에 대한 항암작용과 그에 따른 항산화효소 활성변화. 한국식품과학회지. 제36권, 제6호, 2004년 12월, pp. 968-973.

(73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
(72) 발명자
방미애
광주광역시 북구 우치로537번길 10, 103동 101호 (일곡동, 동아아파트)
정종기
전라남도 나주시 노안면 노안로 533
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

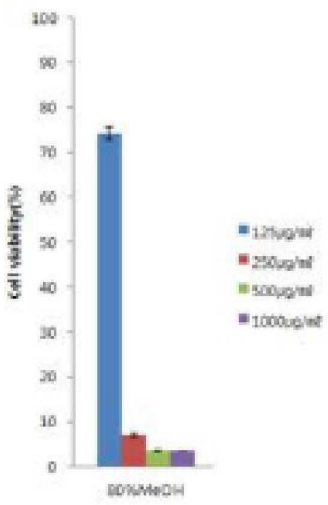
전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **얼레지 추출물을 포함하는 항암 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다. 상기 얼레지 추출물은 암세포를 이용하여 측정한 항암효과 즉, 암세포에 대한 세포사멸 효과가 있을 뿐만 아니라, 천연물 추출물이므로 부작용과 안전성 관련 문제가 거의 없으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 항암 조성물은 암을 치료, 예방 또는 개선하기 위하여 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)

(72) 발명자
홍희철
전라남도 나주시 노안면 엄동길 6
정보람
전라남도 함평군 함평읍 금곡길 2-16
송원섭
전라남도 순천시 중앙로 225-12 (매곡동)
부희옥
서울특별시 노원구 덕릉로 517, 106동 906호(중계동, 중계건영2차아파트)
정의수
강원도 원주시 시청로 64, 106동 501호(무실동,요진아파트)
최경민
전라북도 전주시 덕진구 석소로 55, 101동 1005호 (인후3동,아중현대아파트)
신현경
서울특별시 강남구 학동로44길 18-5 (논현동)
고철종
부산광역시 강서구 신호산단5로 60-11 (신호동)
김동욱
대전광역시 중구 서문로 96, 206-1204호 (문화동, 센트럴파크)
신창식
서울특별시 서초구 효령로 391 무지개아파트 8동 108호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 311013-03-1-HD110
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 생명산업기술개발사업 연구개발 분야 융복합
연구과제명 순천지역에 농림자원을 활용한 고부가가치문화 관광상품개발
기 여 율 1/1
주관기관 순천대학교
연구기간 2011.08.19 ~ 2012.08.18

명 세 서

청구범위

청구항 1

얼레지(*Erythronium japonicum*) 잎 분말시료에 80% 메탄올 수용액을 첨가하고 70℃에서 24시간동안 추출한 후, 여과 및 감압농축과정을 수행한 다음 -20℃에서 동결건조하여 얼레지 잎 추출물 분말을 제조하는 단계; 및

상기 얼레지 잎 추출물 분말에 헥산(Hexane), 물(H_2O) 및 메탄올(Methanol)을 부피를 기준으로 10:9.5:0.5로 혼합하여 제조된 혼합용매를 첨가하고 혼합한 후, 층이 분리되도록 방치한 다음 윗층인 헥산층을 제거하는 과정, 헥산층을 제거하고 남은 나머지 용액에 동일한 양의 클로로포름($CHCl_3$)을 첨가하고 혼합한 후, 층이 분리되도록 방치한 다음 윗층인 클로로포름층을 제거하는 과정, 클로로포름 층을 제거하고 남은 나머지 용액에 동일한 양의 에틸아세테이트(EtOAc)를 첨가하고 혼합한 후, 층이 분리되도록 방치한 다음 윗층인 에틸아세테이트층을 제거하는 과정 및 에틸아세테이트 층을 제거하고 남은 나머지 용액에 동일한 양의 부탄올(BuOH)을 첨가하고 혼합한 후, 층이 분리되도록 방치한 다음 윗층인 부탄올층을 수득하는 과정을 포함하는 얼레지 잎 부탄올 분획물을 제조하는 단계

를 포함하는 항암 활성이 우수한 얼레지 잎 부탄올 분획물을 제조하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항암효과가 있는 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 제어되지 않는 세포성장으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포성장에 의해 종양(tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 정상조직 또는 기관으로 침윤하여 파괴시키고 새로운 성장장소를 만들 수 있어 개체의 생명을 빼앗아 갈 수 있는 질환군을 총칭한다.

[0003] 이러한 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있고, 의학 기술 또한 혁신적으로 발전하고 있음에도 불구하고, 암의 발생 및 암에 의한 사망은 계속 증가추세에 있다. 세계 보건 기구의 최근 통계 자료에 의하면 전세계적으로 연간 약 1천만 명 이상의 새로운 암환자가 발생하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라에서도 암은 가장 높은 사망원인으로 연간 약 십만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 암에 의해 사망하고 있다.

[0004] 암의 발생요인으로는 여러 가지가 있으며, 유전인자 또는 면역학적 요인 등의 내적 요인과 화학물질, 방사선 또는 바이러스 등의 외적 요인으로 구분되기도 한다. 특히, 최근 암 환자의 증가와 관련하여, 현대 사회에서 암이 발생되는 원인은 유전적 요인보다 환경적 요인이 더 큰 비중을 차지하고 있는 것으로 알려져 있고, 특히 식생활에서 오는 발암률은 환경적 요인의 36%로서 매우 높은 것으로 알려져 있어서, 현대 사회에서의 생활환경이 근원적으로 변화되지 않는 이상 이러한 암의 발병률 및 암에 의한 사망자 수의 증가추세는 계속해서 유지될 것으로 보인다. 특히, 암은 조기에 발견되지 못할 경우 완치가 거의 불가능하고, 병이 진전될수록 환자와 가족의 고통과 경제적 손실이 막대하며, 의료 보험의 재정고갈 등 사회적으로도 큰 비용을 초래한다는 점에서 암의 예방과 조기 치료의 중요성은 더욱 강조되고 있는 실정이다.

[0005] 최근에는 암의 발생과 전이, 암세포의 생리, 암의 진단과 치료에 대한 연구와 함께 식품을 비롯한 항암 효과를 지니는 물질 검색을 통하여 새로운 암 치료제가 개발되고 있는 추세이다. 이와 관련하여, 기존 화학요법에 사용되는 화학물질의 경우 강한 세포독성으로 인하여 많은 부작용이 유발되므로, 종래 천연물, 특히 식물 또는 식물생약으로부터 항암제를 개발하려는 연구가 이루어지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-1050003 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 암세포 사멸효과가 우수한 천연물 유래 항암 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 천연물 즉, 식물 유래 유효성분을 포함하는 항암 조성물을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명은 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물일 수 있다. 또한, 본 발명은 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 개선 또는 예방용 식품 조성물일 수 있다.

[0010] 본 발명의 발명자들은 상기 얼레지 추출물은 인간의 간암 유래 세포인 HepG2 세포를 이용하여 MTT 분석을 수행한 결과 암세포 사멸효과가 있고, 특히 분획물 중에서 부탄올 분획물의 암세포 사멸효과가 매우 우수하다는 것을 확인하여, 이를 토대로 본 발명을 완성하였다.

[0011] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0012] 본 발명은 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.

[0013] 상기 얼레지(Dog-tooth Violet, *Erythronium japonicum*)는 백합과에 속하는 여러해살이풀로, 가재무릇이라고도 한다. 상기 얼레지는 높은 지대의 비옥한 땅에서 주로 자라며, 산골짜기에서 자라는 것도 있고, 한국 및 일본 등지에 분포한다. 상기 얼레지의 잎은 달걀 모양 또는 타원형으로 녹색 바탕에 자주색 무늬가 있고 가장자리가 밋밋하며, 잎몸은 긴 타원형이고, 꽃잎은 바소꼴로, 6개이며 뒤로 말리고 자주색이고, 6개의 수술과 1개의 암술이 있다. 또한, 상기 얼레지의 열매는 7월 내지 8월에 결실하며 삭과로 넓은 타원형 또는 구형이다. 상기 얼레지는 야생화이지만, 최근 관상용으로 각광받고 있고, 민간의학에서 위장기능을 향상시키는 작용이 있어 구토와 설사를 멎게하는 것으로 알려져 있고, 잎은 나물로 식용되어 왔다.

[0014] 상기 얼레지 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 얼레지의 꽃, 잎, 가지, 뿌리, 열매 또는 껍질이나 이의 분쇄물, 바람직하게는 얼레지의 잎에 추출용매를 가함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다.

[0015] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 희석수, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 희석수는 알콜을 50 내지 99.9%(v/v)로 물에 희석한 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 얼레지 추출물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 희석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 75% 내지 99% 에탄올 수용액 또는 75% 내지 99% 메탄올 수용액일 수 있다. 상기 추출과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간일 수 있다.

[0017] 본 발명의 얼레지 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 냉침추출법, 온침추출법, 열 추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.

[0018] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로

로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매, 바람직하게는 부탄올, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매, 더욱 바람직하게는 부탄올 및 클로로포름로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매, 더더욱 바람직하게는 부탄올로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다. 또한, 상기 분획과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0019] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0020] 본 발명의 얼레지 잎 메탄올 수용액 추출물은 암세포인 HepG2에 대한 MTT 분석결과, 250 ㎍/㎖ 이상을 처리한 경우에 처리 전 암세포의 약 90% 이상의 암세포에 대한 암세포 사멸효과를 가지고, 상기 80% 메탄올 수용액 추출물에 비하여, 부탄올, 클로로포름 또는 에틸아세테이트로 분획한 경우 더 우수한 사멸효과를 가지며, 특히 부탄올로 분획한 분획물의 경우 125 ㎍/㎖를 처리한 경우에도 암세포의 약 90% 이상의 암세포에 대한 암세포 사멸효과를 가지는 것으로 확인되었다.

[0021] 상기 항암 조성물의 유효성분인 얼레지 추출물은 항암 활성이 우수할 뿐만 아니라, 식용으로 사용될 수 있는 천연식물을 이용하여 제조한 것이므로 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수하므로, 상기 항암 조성물은 암의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 또는 암의 개선 또는 예방을 위한 식품 조성물로 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명의 항암 조성물, 구체적으로 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물 또는 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물은 유효성분으로 상기 얼레지 추출물을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 암은 악성 종양(malignant tumor)이라고도 하며, 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리로 주위 조직에 침윤하면서 빠르게 성장하고 신체 각 부위에 확산되거나 전이되어 생명을 위협하게 되는 질환을 의미하고, 상기 암은 암종(carcinoma)과 육종(sarcoma)을 포함하며, 일예로 유방암, 위암, 간암, 폐암, 대장암, 자궁경부암, 자궁내막암, 뇌척수종양, 두경부암, 흉선종, 식도암, 췌장암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병 및 다발성 골수종 등일 수 있다.

[0024] 상기 암 치료 또는 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0025] 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물은 상기 암 치료 또는 예방용 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.

[0026] 이 경우 상기 조성물 내 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물의 함량은 0.001 중량 % 내지 99.9 중량 %, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 20 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용 태양 및 사용방법에 따라 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물의 함량은 약학적으로 유효한 양 또는 바람직한 양으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.

[0027] 상기 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 의미한다. 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0028] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프

로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 또한, 상기 암 치료 또는 예방용 조성물은 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 항암제로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.

[0030] 상기 암 치료 또는 예방용 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0031] 또한, 상기 암 치료 또는 예방용 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캅셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSTESIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0032] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOULTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.

[0033] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.

[0034] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0035] 또한, 본 발명은 본 발명의 항암 조성물 또는 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다. 상기 본 발명의 항암 조성물 또는 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 개선 또는 예방용 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0036] 상기 얼레지 추출물은 얼레지 잎 알코올 수용액 추출물, 구체적으로는 상기 얼레지 잎 알코올 수용액 추출물 또는 상기 추출물의 부탄올, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 분획한 분획물, 바람직하게는 상기 추출물의 부탄올 분획물일 수 있다.

[0037] 본 발명의 식품 조성물의 예로는 식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제를 들 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0039] 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물이 포함될 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영아식 또는 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실,채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스

크림류 등), 천연조미료, 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0040] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 ㎖ 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g, 바람직하게는 5 g 내지 12 g일 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 쥬스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0042] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제는 본 발명의 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부, 바람직하게는 0.00001 중량부 내지 15 중량부 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명에서 기능성 음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.

[0044] 상기 기능성 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 중량부 내지 20 중량부, 바람직하게는 1 중량부 내지 18 중량부, 더욱 바람직하게는 5 중량부 내지 12 중량부 포함될 수 있다.

[0045] 또한, 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 개선 또는 예방용 식품 조성물에 있어서, 상기 항암 조성물 또는 상기 얼레지 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0046] 본 발명의 얼레지 추출물은 암세포에 대한 MTT 분석결과 암세포 사멸효과를 가지며, 종래에서부터 식품으로 사용되던 식물의 추출물로 안전성이 인정될 뿐만 아니라 부작용도 문제되지 아니하므로, 간암을 포함한 다양한 암의 치료, 개선 및 예방을 위하여 여러 방면으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 얼레지 추출물 및 분획물의 제조과정을 나타낸 순서도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 간암세포주인 HepG2 세포주를 이용하여, 얼레지 추출물의 항암효과를 MTT assay법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 각 수치는 80% 메탄올 수용액 얼레지 추출물의 첨가량을 나타내고, 세로축의 수치는 세포 생존수를 상대적 수치로 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 간암세포주인 HepG2 세포주를 이용하여, 얼레지 추출물 및 분획물의 항암효과를 MTT assay법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프의 가로축은 추출용매 또는 분획용매를 나타낸 것이고, 상기 그래프의 각 수치는 추출물 및 분획물의 첨가량을 나타낸 것이며, 상기 그래프의 세로축의 수치는 세포 생존수를 상대적 수치로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐으로 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으므로, 이는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0049] **<실시예 1> 얼레지추출물의 제조**

[0050] 2011년 채취한 순천 조계산 일원의 자생식물인 얼레지(*Erythronium* japonicum) 잎을 -20℃에서 동결건조하여 분말화하였다. 상기 분말화된 얼레지 추출물 및 분획물의 제조는 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 얼레지 분말시료 300 g을 80% 메탄올 수용액 3 L에 침지한 후, 온침 추출법으로 추출하고, 상기 추출물에 순차적으로 유기용매를 처리하여 분획물을 제조하였다.

[0051] 보다 구체적으로, 상기 얼레지 잎, 꽃, 줄기 및 뿌리 각 300g에 80% 메탄올 수용액 3 L를 가하여 상기 얼레지 잎, 꽃, 줄기 및 뿌리를 각각 추출용매에 완전히 침지시킨 후, 70℃에서 환류시키면서 24시간 동안 추출하였다. 상기 추출을 통해 제조된 각 부위의 얼레지 추출액을 여과하여 여액을 취하고, 상기 여액을 각각 감압농축기를 이용하여 감압 농축한 뒤, -20℃에서 동결건조하여 분말을 수득하는 방법으로 추출물을 제조하였다.

[0052] 상기 제조된 얼레지 잎 80% 메탄올 추출물에 헥산(Hexane), 물(H_2O) 및 메탄올(Methanol)을 부피를 기준으로 10:9.5:0.5로 혼합하여 제조된 혼합용매의 약 3 L를 가한 후, 좌우로 흔들어 준 뒤 층이 분리되도록 방치하였다. 상기 방치에 의해 층이 분리된 후, 분리된 층 중 윗층인 헥산 분획층과 수층 중 헥산 분획층을 수기에 분리함으로써 헥산 분획액을 제조하였다. 상기 헥산 층을 분리하고 남은 나머지 용액(물층)에 동일한 양의 클로로포름($CHCl_3$)을 첨가하고 분획하여 클로로포름 층만을 분리함으로써 클로로포름 분획액을 제조하였고, 상기 클로로포름 층을 분리하고 남은 나머지 용액(물층)에 동일한 양의 에틸아세테이트(EtOAc)를 첨가하고 분획하여 에틸아세테이트 층만을 분리함으로써 에틸아세테이트 분획액을 제조하고, 상기 에틸아세테이트 층을 분리하고 남은 나머지 용액(물층)에 동일한 양의 부탄올(BuOH)을 첨가하고 분획하여 부탄올 층만을 분리함으로써 부탄올 분획액을 제조하고, 나머지 용액을 물(water) 분획액으로 사용하였다.

[0053] 상기 분획을 통해 제조된 각 용매별 얼레지 분획액을 각각 감압농축기를 이용하여 감압 농축한 뒤, -20℃에서 동결건조하여 분획물을 제조하였다. 상기 제조된 추출물 및 분획물은 수율은 다음 표 1과 같다.

표 1

[0054]

용매 종류	추출물/분획물 함량(g)	수율(%)
80% MeOH	77.220	26.54
Hexane	2.973	3.85
$CHCl_3$	2.109	2.73
EtOAc	0.233	0.30
BuOH	7.354	9.52
Water	54.75	70.90

[0055] 상기 제조된 추출물 및 분획물은 각각 -20℃에서 실험에 사용되기 전까지 보관하였고, 실험에 사용하기 위하여, 각 추출물 및 분획물을 DMSO로 녹여 사용하였다.

[0056] **<실시예 2> 항암효과 측정-암세포 사멸 효과**

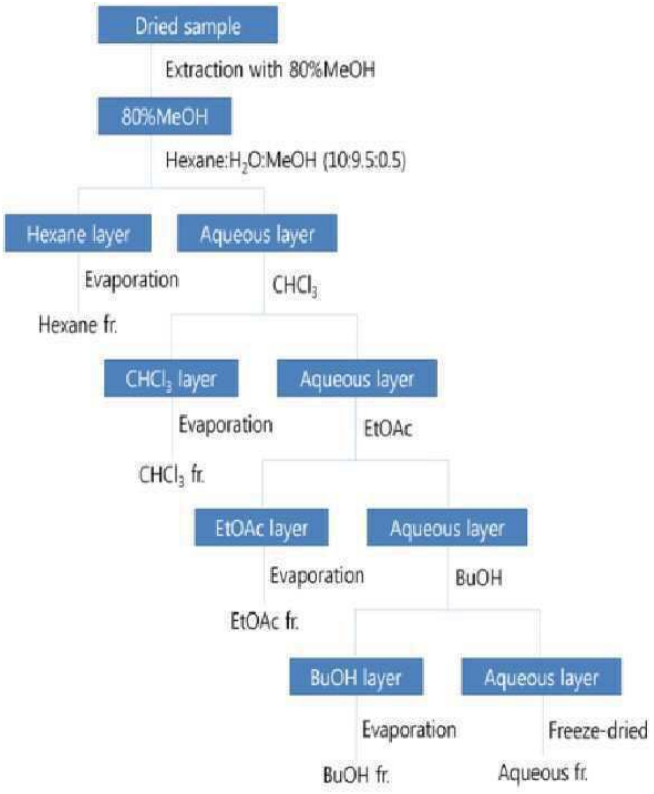
[0057] 상기 실시예 1에서 제조된 얼레지 추출물의 항암효과를 측정하기 위하여, 인간의 간암세포인 간암 유래 세포인 HepG2 세포를 이용하였다. 상기 HepG2 세포는 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/ Nutrient Mixture Ham's F12) 및 FBS(fetal bovine serum)를 이용한 배지에서 배양하였다.

[0058] 상기 배양한 HepG2 세포를, 50,000 cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주하여, 24시간 배양하였다. 상기 배양 후, 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 다양한 농도의 상기 실시예 1의 얼레지 추출물 또는 분획물을 첨가하고 6시간 동안 배양한 후, MTT assay를 수행하였다. 구체적으로, 상기 MTT assay는 상기 실시예 1의 얼레지 추출물 또는 분획물을 첨가하고 6시간 동안 배양한 각 well에 PBS 완충액에 녹인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 용액 25 μl씩을 더 첨가하고 4시간 더 배양한 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흩어지지 않게 상등액을 제거하고, DMSO 100 μl에 녹여 ELIZA microplate reader(molecula Devices, SunnyvaleCA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 수행하였다.

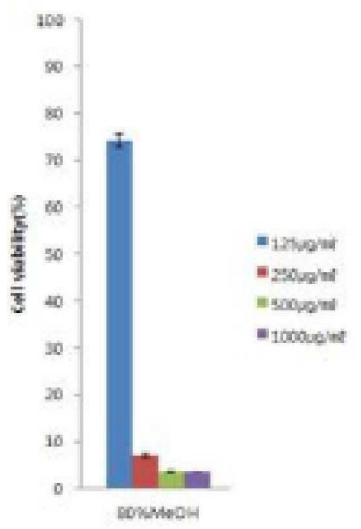
[0059] 상기 도 2에 나타낸 바와 같이, 얼레지 추출물을 125 ㎍/㎖ 처리한 실험군에서는 암세포 사멸효과가 약한 것으로 확인되었으나, 250 ㎍/㎖ 처리한 실험군에서는 유의적인 암세포 사멸효과가 나타났다. 상기 결과로부터, 본 발명의 얼레지 메탄올 수용액 추출물은 250 ㎍/㎖에서도 유의하게 암세포 사멸효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한, 상기 도 3에 나타낸 바와 같이, 얼레지 추출물을 125 ㎍/㎖ 처리한 실험군에서는 부탄올 분획의 경우 현저하게 우수한 암세포 사멸효과를 갖는 것으로 확인되었고, 클로로포름 또는 에틸아세테이트 분획의 경우에도 메탄올 수용액 추출물이나 다른 분획에 비하여 항암 효과가 우수한 것으로 확인되었다.

도면

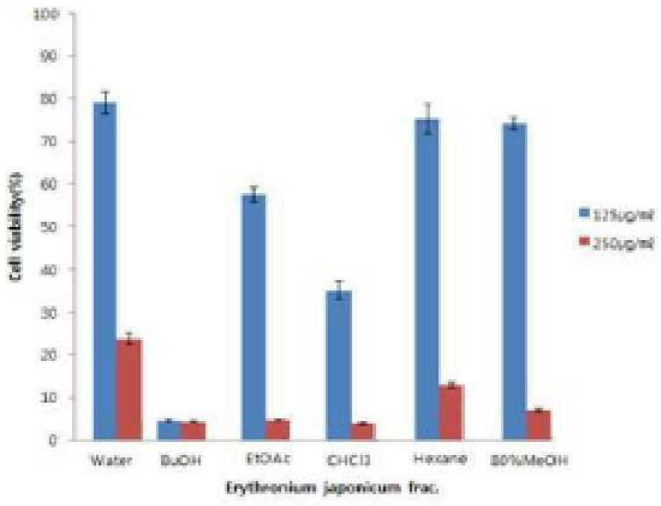
도면1



도면2


Cell viability(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
80%MeOH
125ug/ml
250ug/ml
500ug/ml
1000ug/ml

도면3


Cell viability(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Water
BuOH
EtOAc
CHCl3
Hexane
80%MeOH
Erythronium japonicum frac.
125ug/ml
250ug/ml