(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월27일
(11) 등록번호 10-2257023
(24) 등록일자 2021년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A23L 2/38* (2021.01)
A23L 2/52 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A23L 2/38 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2020-0005197
(22) 출원일자 2020년01월15일
심사청구일자 2020년01월15일
(56) 선행기술조사문헌
KR101499457 B1
KR1020150117514 A*
Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2016, 80(1), 80-88
Korean Journal of Food Preservation, 2016, 23(2), 233-238*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
김택중
강원도 원주시 흥업면 분지동1길 46-11
(74) 대리인
김보정

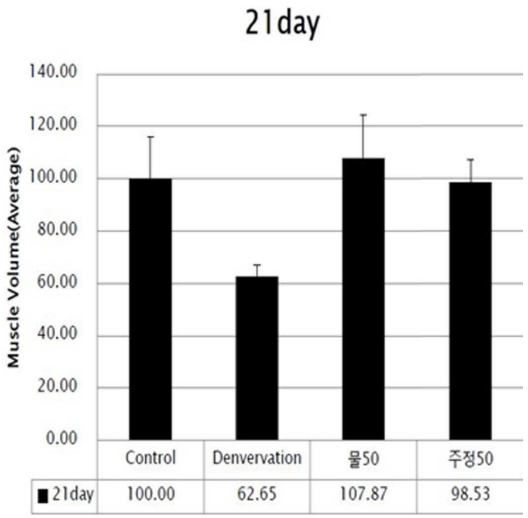
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 **겹달맞이꽃 추출물을 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방, 치료 또는 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 추출물을 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명의 따라 환류냉각추출법으로 추출한 겹달맞이꽃 열수 추출물은 세포독성이 없고, 근세포 손상 및 근육량 감소를 억제하며, 근감소증을 회복하는 효능을 나타내므로, 근위축증 또는 근감소증 예방, 치료 또는 개선용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있고, 건강기능식품 개발에 적용될 수 있다.

대 표 도 - 도3b



(52) CPC특허분류
A23L 2/52 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/316 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018-51-0249
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	중소기업기술개발 지원사업
연구과제명	노인성 근육감소 예방 및 개선용 건강기능식품소재 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 원주산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

환류냉각추출로 추출된 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 환류냉각추출로 추출된 겹달맞이꽃 열수 추출물은 겹달맞이꽃의 꽃, 잎, 가지, 뿌리, 열매 및 씨앗 껍질로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 추출물인 것을 특징으로 하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 환류냉각추출로 추출된 겹달맞이꽃 열수 추출물은 겹달맞이꽃의 뿌리 추출물인 것을 특징으로 하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 근위축증의 예방 또는 치료는 근세포 손상 또는 괴사를 억제하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 경피, 자궁 내 경막 및 뇌혈관 내 주사로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 투여경로로 투여되는 것을 특징으로 하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

환류냉각추출로 추출된 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근위축증 또

는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 건강기능식품 조성물은 환류냉각추출로 추출된 겹달맞이꽃 열수 추출물을 0.0001 내지 100 중량% 포함하는 것을 특징으로 하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 12

환류냉각추출로 추출된 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 13

환류냉각추출로 추출된 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 음료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 추출물을 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 세포독성이 없고, 근세포 손상 및 근육량 감소를 억제하며, 근감소증을 회복하는 효능을 나타내는 겹달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 척수신경, 운동신경 또는 골격근 섬유의 퇴행에 의해 유발되는 근감소증은 아직까지 발병원인이 규명되지 않은 대표적인 난치성 질환의 하나로, 근육 섬유의 수 및 단면적의 감소로 인한 골격근의 근육량 감소로 정의된다. 근감소증의 근본적인 발병원인이 아직 규명되지 않았고, 운동신경이나 골격근의 퇴행을 방지하거나 또는 회복시킬 수 있는 방법이 개발되지 않고 있기 때문에, 현재로서는 상기 근감소증의 진행을 둔화시키는 방법을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 현재 상기 근감소증의 치료 방법으로는 주로 근감소증의 일종인 근육세포의 퇴행 또는 진행성 변이에 의해 유발되는 근위축증을 억제하는 방법이 사용되고 있다. 예를 들어, WO 2007/088123에는 니트록시 유도체를 유효성분으로 포함하는 근위축증 치료제가 개시되어 있고, WO 2006/081997에는 아트라릭산 또는 그의 유도체를 유효성분으로 포함하는 근위축증 치료제가 개시되어 있다. 그러나, 화합물을 유효성분으로 포함하는 이들 치료제는 근위축증이 발병된 골격근 뿐만 아니라, 근위축증과 관련되지 않은 내장근 또는 심근에도 작용하기 때문에, 크고 작은 다양한 부작용이 유발될 수 있어, 실질적인 치료에 사용되지 못하고 있다.

[0006] 한편, 근위축증(muscular atrophy)은 사지의 근육이 거의 좌우대칭적으로 점점 위축되어 가는 질환으로, 기계적 자극의 부재, 기아 및 암 등의 다양한 원인으로 발생된다. 근위축증은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실 또는 근육 자체의 병 또는 근육을 지배하는 신경의 손상으로 정의할 수 있다. 일반적으로는 근육을 사용하지 않음으로써 심각한 근육 강도 손실이 발생해 점차 근위축증으로 진행하게 되는 경우가 있으며, 이에 더해 중력이 없는 곳에서 생활하는 사람의 경우 또한 칼슘과 근육 강도의 감소에 의해 근력이 저하되는 증상을 보이는 경우가 있다. 근육 자체의 병으로 인한 근위축증은 중증 근무력증(myasthenia gravis), 근이영양증(dystrophy) : 진행성근이영양증, 근긴장성근이영양증, 듀센형, 베커형, 지대형, 안면견갑상완형과 근육 자체에 발생하는 염증 등이 있고, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축증은 척수성 근위축증(spinal muscular amyotrophy) : 베라드니히-호프만형, 쿠겔베르그-벨란더병, 근위축증성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) : 루게릭병, 척수구 근위축증(spinobular muscular atrophy) : 케네디병 등이 있다. 예컨대, 비록 운동 또는 다른 대응책들이 계속적으로 가해진다고 해도 우주비행 또는 장애조건들과 같이 불가피하게 근

육 퇴화가 진행된다.

[0007] 근위축증은 크레아틴 키나아제(Creatine kinase: CK), 근전도검사, 근육생검, 분자생물학적 유전자검사, 세포유전학적 검사 등을 통해 진단이 이루어지며, 현재까지의 근위축증에 대한 주된 치료방법은 물리치료와, 합병증 및 기형, 기능 장애 예방을 위한 작업치료, 호흡치료의 병행, 그리고 추가적으로 대증요법(symptomatic treatment)과 지지요법(supportive therapy)을 시도하는 것이 유일한 대응방법이다. 따라서, 장애 조건을 극복할 수 있는 다른 대응책에 대한 연구가 요구되고 있으며, 그러한 대응책에 대한 적당한 접근으로 근섬유 단백질들의 위축을 유도하는 상태 하에서도 근육량을 유지하도록 도울 수 있는 천연물유래 기능성 생물소재를 이용하는 것이 있다.

[0008] 특히, 열충격 단백질(heat shock protein) HSP70은 근조직이 위축될 때 발현이 감소하고, 과발현될 경우 근위축증을 완화하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 열충격 단백질 HSP70은 산화 스트레스를 포함한 여러 스트레스 인자로부터 세포를 보호하는 역할을 하고 단백질 접힘(protein folding) 및 수선(repairing)을 돕는 역할을 한다(Journal of Life Science 2014 Vol. 24. No. 9. 1019~1024). 그러므로 HSP70의 근위축증 억제 효과를 염두에 두고 근위축증에 의해서 유도되는 산화 스트레스로부터 근세포를 보호하는 천연물을 찾는 것이 합리적이다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 근육조직의 손실 또는 근육 자체의 위축을 억제하여 근위축증 또는 근감소증을 예방 또는 치료할 수 있는 천연물 유래 기능성 생물소재를 개발하기 위해 노력한 결과, 환류냉각추출법으로 추출한 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 열수 추출물이 세포독성이 없고, 근세포 손상 및 근육량 감소를 억제하며, 근감소증을 회복하는 효능을 나타내는 것을 확인하여, 근위축증 또는 근감소증 예방, 치료 또는 개선을 위한 새로운 소재로 이용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 추출물을 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 겹달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은 겹달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 식품 조성물, 또는 음료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 따라 환류냉각추출법으로 추출한 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 열수 추출물은 세포독성이 없고, 근세포 손상 및 근육량 감소를 억제하며, 근감소증을 회복하는 효능을 나타내므로, 근위축증 또는 근감소증 예방, 치료 또는 개선용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있고, 건강기능식품 개발에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 추출방법으로 환류냉각추출법 또는 침지추출법을 이용하고, 추출용매로 100%물, 30%주정, 50%주정, 70%주정, 100%주정을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 추출물을 정상 근육세포(C2C12)에 0, 10, 100, 200 ㎍/㎖ 농도로 처리한 후 세포독성을 확인한 도이다.

도 2는 추출방법으로 환류냉각추출법 또는 침지추출법을 이용하고, 추출용매로 100%물, 30%주정, 50%주정, 70%주정, 100%주정을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 추출물을 H_2O_2로 세포 괴사를 유도한 근육세포(C2C12)에 0, 10, 100, 200 ㎍/㎖ 농도로 처리한 후 세포 생존율을 확인한 도이다.

도 3a는 궁등신경 절제술로 인위적으로 근감소증을 유도한 마우스 모델에서 생체 마이크로-CT를 이용하여 근감

소증에 대한 겹달맞이꽃 추출물의 경구 투여 효과를 관찰한 도이다.

도 3b는 궁등신경 절제술로 인위적으로 근감소증을 유도한 마우스 모델에서 생체 마이크로-CT를 이용하여 관찰한 근감소증에 대한 겹달맞이꽃 추출물의 경구 투여 효과를 그래프화한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명에서 용어 "예방" 은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 (ⅰ) 질환 또는 질병의 발전의 억제; (ii) 질환 또는 질병의 경감; 및 (iii) 질환 또는 질병의 제거를 의미한다.

[0025] 본 발명은 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명에서, 상기 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.)은 높이 30 내지 100 ㎝의 2년생 초본으로, 볕이 잘 드는 강가나 길가, 빈터 등에서 자생한다. 근출엽은 도피침 형태로 끝이 뾰족하거나 둔하고, 경생엽은 어긋나며 엽면이 주름지지 않은 형태를 가진다.

[0027] 본 발명에서, 본 발명의 유효성분인 겹달맞이꽃 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

[0028] 1) 겹달맞이꽃에 추출용매를 가하여 추출하는 단계; 및

[0029] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계.

[0030] 본 발명에서, 상기 단계 1)의 겹달맞이꽃은 재배한 것 또는 시판되는 것을 제한없이 사용할 수 있다. 또한, 상기 겹달맞이꽃는 겹달맞이꽃의 꽃, 잎, 가지, 뿌리, 열매 및 씨앗 껍질로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 부위를 사용하는 것이 바람직하고, 뿌리를 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0031] 본 발명에서 상기 단계 1)의 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하는 것이 바람직하고, 물인 것이 더욱 바람직하다. 또한, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸 아세테이트, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 및 디클로로메탄으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 것이 바람직하고, 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 에탄올일 수 있다. 추출방법으로는 초음파추출, 진탕추출, 속슬렛(Soxhelt)추출, 환류냉각추출 또는 침지추출을 이용하는 것이 바람직하고, 환류냉각추출을 이용하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 추출용매를 세척하고 잘 건조된 겹달맞이꽃 분량의 5 내지 30배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 7 내지 25배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하며, 9 내지 11배 첨가하여 추출하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 추출 온도는 20 내지 100℃인 것이 바람직하고, 40 내지 80℃인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 1 내지 12시간이 바람직하고, 2 내지 6시간이 더욱 바람직하며, 3시간이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 아울러 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0032] 상기와 같은 과정을 통해 제조된 추출물은 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, 일 예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있고, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0033] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 환류냉각추출법으로 추출한 겹달맞이꽃 열수 추출물은 세포독성이 없고, 근세포 손상 및 근육량 감소를 억제하며, 근감소증을 회복하는 효능을 나타내므로, 근위축증 또는 근감소증을 안전하면서도 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드

혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스 또는 양모지 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0036] 또한, 상기 약학 조성물은 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제, 주사제 또는 활성 화합물의 서방출제형의 제제형태일 수 있다. 근위축증 예방 및 치료를 위한 약학 조성물은 경구 또는 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 약학분야에서 통상 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0037] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0038] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 한편, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 예컨대, 성인의 경우, 본 발명의 달맞이꽃 추출물은 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01~500 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있다. 바람직하게는 0.1~200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1~100 mg/kg을 일일 1 내지 3회 투여할 수 있다.

[0040] 이렇게 제형화 된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 일정시간 간격으로 수회 투여할 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학 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, 경피 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0044] 아울러, 본 발명은 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0045] 본 발명에서, 상기 겹달맞이꽃 추출물은 0.0001 내지 100 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0046] 또한, 상기 겹달맞이꽃 추출물의 추출방법 및 추출대상은 상기 겹달맞이꽃 추출물을 유효성분으로 함유하는, 근위축증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 기재된 내용과 동일하므로, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용하고, 이하에서는 건강기능식품 조성물 및 식품 조성물의 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.

[0047] 한편, 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 환류냉각추출법으로 추출한 겹달맞이꽃 열수 추출물은 세포독성이 없고, 근세포 손상 및 근육량 감소를 억제하며, 근감소증을 회복하는 효능을 나타내므로, 식품 및 음료 개발에 적용할 수 있고, 근육 노화 및 근육량 감소 억제, 또는 운동기능 향상을 위해 일상적으로 섭취할 수 있는 건강기능식품 조성물로 사용할 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 "건강기능식품"이란, 본 발명의 달맞이꽃 추출물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다.

[0050] 본 발명에 따른 식품 조성물은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 등의 모든 식품을 포함한다. 식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할

수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 ~ 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 ~ 20 중량%의 범위이다. 또한, 과립, 정제 또는 캡슐형태의 식품의 경우에는 통상 0.1~ 100 중량%, 바람직하기로는 5 ~ 100 중량%의 범위에서 첨가하면 된다.

[0052] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0053] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

[0055] **<실시예 1> 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 추출물의 제조**

[0056] 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.)은 2018년 충청북도 음성군 달꽃농원에서 수확되었다. 또한, 국립생물자원관에 형태학적 종 판별을 의뢰하여 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.)임을 확인하였다. 판별을 완료한 겹달맞이꽃의 뿌리를 조분쇄하여 시료로 사용하였고, 시료의 추출은 다음과 같이 추출하였다.

[0058] **<1-1> 환류냉각추출법을 이용한 겹달맞이꽃 추출물의 제조**

[0059] 겹달맞이꽃 뿌리 조분쇄 시료 40 g에 10배 부피(360 ㎖)의 추출용매(100%물, 30%주정, 50%주정, 70%주정 또는 100%주정)를 넣고, 60℃에서 3시간 동안 환류냉각 추출한 다음, 필터페이퍼로 감압여과하였다. 감압여과하여 얻어진 여과추출물을 50℃로 감압농축하고, 동결건조하여 최종적으로 겹달맞이꽃 열수 추출물, 겹달맞이꽃 30%주정 추출물, 겹달맞이꽃 50%주정 추출물, 겹달맞이꽃 70%주정 추출물 및 겹달맞이꽃 100%주정 추출물 분말을 획득하였다.

[0061] **<1-2> 침지추출법을 이용한 겹달맞이꽃 추출물의 제조**

[0062] 겹달맞이꽃 뿌리 조분쇄 시료 67 g에 25배 부피(1,600 ㎖)의 추출용매(100%물, 30%주정, 50%주정, 70%주정 또는 100%주정)를 넣고, 실온에서 3시간 동안 침지하여 추출한 다음, 필터페이퍼로 감압여과하였다. 감압여과하여 얻어진 여과추출물을 50℃로 감압농축하고, 동결건조하여 최종적으로 겹달맞이꽃 열수 추출물, 겹달맞이꽃 30%주정 추출물, 겹달맞이꽃 50%주정 추출물, 겹달맞이꽃 70%주정 추출물 및 겹달맞이꽃 100%주정 추출물 분말을 획득하였다.

[0064] **<실험예 1> 근육세포에서 겹달맞이꽃 추출물의 세포독성 확인**

[0065] **<1-1> 근육세포 배양**

[0066] 정상 근육세포(C2C12)를 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)이 5% 함유된 DMEM 배지에서 배양하였다. 즉, 75 ㎠ 플라스틱 플라스크(Falcon Co, England)에 정상 골격근육세포를 10% FBS, 75% $NaHCO_3$ 150 ㎍/㎖, 글루타민 584 ㎍/㎖ 및 항생제(antibiotic)/항진균제(antimycotics) 44 ㎕/㎖가 함유된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO_2의 조건하에서 배양하였다. 2~3일마다 한 번씩 2차 배양하여 세포주를 유지하였다.

[0068] **<1-2> 근육세포 정량**

[0069] 세포가 자란 75 ㎠ 플라스틱 플라스크에서 배지액을 제거하고, CMF-PBS (calcium magnesium free-phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세척한 후, 0.25% 트립신/EDTA를 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 세포 배양액으로 중화시켜서 원심분리(1500 rpm, 3min) 하였다. 남은 세포의 펠렛(pellet)에 배양액을 가한 다음, 멸균 피펫으로 반복 흡입하여 단일세포 부유액을 만든 후 트립판 블루(trypan blue)를 세포 부유액과 9:1의 비율로 혼합하여 광학현미경 상에서 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 측정하였다.

[0071] **<1-3> 근육세포에서 겹달맞이꽃 추출물의 세포독성 확인**

[0072] 근육세포에서 상기 <실시예 1>에서 제조한 겹달맞이꽃 추출물의 세포독성을 확인하였다.

[0073] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>에 기재된 방법으로 배양한 정상 근육세포(C2C12)를 상기 실험예 <1-2>에 기재된 방법으로 정량하여 96웰 플레이트에 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하였다. 이를 37℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양한 후, 상기 실시예 <1-1>에서 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 추출용매별 겹달맞이꽃 추출물(도 1의 100%물 (60℃), 30%주정 (60℃), 50%주정 (60℃), 70%주정 (60℃) 및 100%주정 (60℃)) 및 상기 실시예 <1-2>에서 침지추출법을 이용하여 추출한 추출용매별 겹달맞이꽃 추출물(도 1의 100%물 침지, 30%주정 침지, 50%주정 침지, 70%주정 침지 및 100%주정 침지) 각각을 0, 10, 100, 200 ㎍/㎖의 다양한 농도로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 세포생존율을 24시간 동안 배양한 정상 근육세포를 대상으로 EzCytox 키트를 이용하여 제조사의

절차에 따라 달맞이꽃 추출물의 세포독성을 결정하였다.

[0074] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 침지추출법을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 추출물과 비교하여 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 추출물의 세포 생존율이 보다 우수한 것을 확인하였다. 또한, 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 추출물의 경우 추출용매로 100%물을 이용하여 추출한 열수 추출물이 처리한 모든 농도에서 겹달맞이꽃 추출물을 첨가하지 않은 경우와 유사한 생존율을 보이는 것을 확인하였다.

[0076] **<실험예 2> 근육세포 괴사에 대한 겹달맞이꽃 추출물의 효과 확인**

[0077] 근육세포 괴사에 있어서 상기 <실시예 1>에서 제조한 겹달맞이꽃 추출물의 효과를 알아보기 위하여, 근육세포에 상기 <실시예 1>에서 제조한 겹달맞이꽃 추출물을 농도별로 처리하고, H_2O_2로 근육세포 괴사를 유도한 후, 근육세포 생존률을 측정하였다.

[0078] 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>에 기재된 방법으로 배양한 정상 근육세포(C2C12)를 상기 실험예 <1-2>에 기재된 방법으로 정량하여 24웰 플레이트에 근육세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 넣고 CO_2 배양기에서 배양하였다. 그 다음, 상기 실시예 <1-1>에서 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 추출용매별 겹달맞이꽃 추출물(도 2의 100%물 (60℃), 30%주정 (60℃), 50%주정 (60℃), 70%주정 (60℃) 및 100%주정 (60℃)) 및 상기 실시예 <1-2>에서 침지추출법을 이용하여 추출한 추출용매별 겹달맞이꽃 추출물(도 2의 100%물 침지, 30%주정 침지, 50%주정 침지, 70%주정 침지 및 100%주정 침지) 각각을 0, 10, 100, 200 ㎍/㎖의 다양한 농도로 각각 첨가한 후, 10% FBS-DMEM 배지로 전체부피를 100 ㎕로 조절하여 37℃, 5% CO_2의 조건에서 24시간 배양하였다. 또한, 양성 대조군으로 N-아세틸 시스테인(N-acetyl cysteine, NAC)을 2 mM의 농도로 첨가한 후, 배양하였다. 이 배양액에 H_2O_2를 1 mM 농도로 전체부피가 1 ㎖가 되게 첨가한 다음, 이를 다시 60분 배양하였다. 60분 배양 후 EzCytox 키트를 이용하여 제조사의 절차에 따라 세포생존율을 결정하였다.

[0079] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 겹달맞이꽃 추출물의 농도가 0 ㎍/㎖로부터 200 ㎍/㎖로 증가됨에 따라 농도 의존적으로 H_2O_2에 의한 근육세포 괴사가 억제되어 세포 생존율이 회복됨을 확인하였다.

[0081] 상기 <실험예 1> 및 <실험예 2>를 통해 세포독성을 나타내지 않으면서 근육세포 괴사 억제 효능이 우수한 겹달맞이꽃 추출물은 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 열수 추출물임을 알 수 있다.

[0083] **<실험예 3> 궁등신경 절제술에 의해 근감소증을 유도한 마우스 모델에서 겹달맞이꽃 추출물의 효과 확인**

[0084] 세포독성을 나타내지 않으면서 근육세포 괴사 억제 효능이 우수한, 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 열수 추출물의 근감소증 억제 효과를 알아보기 위하여, 궁등신경 절제술에 의해 근감소증을 유도한 마우스 모델을 제작하고, 이를 이용하여 상기 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 열수 추출물의 경구 투여 효과를 확인하였다.

[0086] **<3-1> 궁등신경 절제술에 의해 근감소증을 유도한 마우스 모델 제작**

[0087] C57BL6 마우스(수컷, 4주령, 중량 약 25 g)를 일주일간 예비 사육시킨 후 대조군, 근감소증 유도군, 근감소증 유도 + 겹달맞이꽃 열수 추출물군, 근감소증 유도 + 겹달맞이꽃 30%주정 추출물군으로 나눈 뒤, 대조군을 제외한 마우스군은 좌골신경을 절제하는 수술을 시행하여 뒷다리 근육에 근감소증을 유도하였다. 대조군 및 근감소증 유도군은 21일 동안 매일 1회 증류수 50 mg/kg을 경구 투여하였다. 또한, 근감소증 유도 + 겹달맞이꽃 열수 추출물군은 21일 동안 매일 1회 상기 실시예 <1-1>에서 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 열수 추출물 50 mg/kg을 경구 투여하였다. 아울러, 근감소증 유도 + 겹달맞이꽃 30%주정 추출물군은 21일 동안 매일 1회 상기 실시예 <1-1>에서 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 30%주정 추출물 50 mg/kg을 경구 투여하였다.

[0088] 이때 근감소증 유도 + 겹달맞이꽃 30%주정 추출물군은 비교군으로 이용하였다.

[0090] **<3-2> 궁등신경 절제술에 의해 근감소증을 유도한 마우스 모델에서 겹달맞이꽃 추출물의 효과 확인**

[0091] 상기 실험예 <3-1>에서 제작한 궁등신경 절제술에 의해 근감소증을 유도한 마우스 모델에서 환류냉각추출법을 이용하여 추출한 겹달맞이꽃 열수 추출물의 경 투여 효과를 확인하였다.

[0092] 구체적으로, 상기 실험예 <3-1>에서 각 그룹의 시료 투여 21일 후에 대조군, 근감소증 유도군, 근감소증 유도 + 겹달맞이꽃 열수 추출물군, 근감소증 유도 + 겹달맞이꽃 30%주정 추출물군 각각의 경골에서 35 ㎛의 해상도의

생체 마이크로 시티(micro computed tomography, micro-CT)로 근육의 전산화 단층 이미지를 촬영하였다(N =5, 100 kV, 100 mA, 790 ms, and a rotation step of 12°). 근감소증을 유도한 마우스는 마취 후 촬영을 진행하였으며 근육 양의 평가를 위해, 경골의 3 차원 모델은 CT-분석기 1.11 (CT-111, Bruker, 독일)을 사용하여 재구성 하였다.

[0093] 그 결과, 도 3a 및 도 3b에 나타낸 바와 같이, 근감소증 유도군은 대조군에 비해 뒷다리 근육이 확연히 위축되어 있고, 근육량이 감소한 것을 확인하였다. 반면, 근감소증 유도 + 겹달맞이꽃 열수 추출물군은 근감소증 유도군과 비교하여 근감소증이 회복되고, 근육량 감소가 억제되는 것을 확인하였다. 또한, 세포독성이 나타나는 겹달맞이꽃 30%주정 추출물을 경구 투여한 마우스군보다 세포독성이 나타나지 않는 겹달맞이꽃 열수 추출물을 경구 투여한 마우스군에서 그 효과가 보다 우수함을 확인하였다.

[0095] 상기 결과를 통해 환류냉각추출법으로 추출한 겹달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.) 열수 추출물은 세포독성이 없고, 근세포 손상 및 근육량 감소를 억제하며, 근감소증을 회복하는 효능이 우수함을 확인하였으므로, 상기 추출물은 근위축증 또는 근감소증 예방, 치료 또는 개선용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있고, 건강기능식품 개발에 적용될 수 있다.

[0097] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0099] **<제조예 1> 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 제제의 제조**

[0100] **<1-1> 산제의 제조**

[0101] 본 발명의 추출물 10 mg

[0102] 유당 1 g

[0103] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0105] **<1-2> 정제의 제조**

[0106] 본 발명의 추출물 0.1 mg

[0107] 옥수수전분 100 mg

[0108] 유 당 100 mg

[0109] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0110] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0112] **<1-3> 캡슐제의 제조**

[0113] 본 발명의 추출물 0.1 mg

[0114] 옥수수전분 100 mg

[0115] 유 당 100 mg

[0116] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0117] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0119] **<1-4> 환의 제조**

[0120] 본 발명의 추출물 1 mg

[0121] 유당 1.5 g

[0122] 글리세린 1 g

[0123] 자일리톨 0.5 g

[0124] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0126] **<1-5> 과립의 제조**

[0127] 본 발명의 추출물 0.15 mg

[0128] 포도당 200 mg

[0129] 전분 600 mg

[0130] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0132] **<제조예 2> 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강식품의 제조**

[0133] **<2-1> 밀가루 식품의 제조**

[0134] 본 발명의 추출물의 0.5 내지 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0136] **<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0137] 본 발명의 추출물의 0.1 내지 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0139] **<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

[0140] 본 발명의 추출물의 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0142] **<2-4> 유제품(dairy products)의 제조**

[0143] 본 발명의 추출물의 5 내지 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0145] **<2-5> 선식의 제조**

[0146] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0147] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0148] 본 발명의 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0149] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0150] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0151] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0152] 본 발명의 추출물(3 중량부),

[0153] 영지(0.5 중량부),

[0154] 지황(0.5 중량부)

[0156] **<제조예 3> 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강음료의 제조**

[0157] **<3-1> 건강음료의 제조**

[0158] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 추출물 100 mL를 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0160] **<3-2> 야채 주스의 제조**

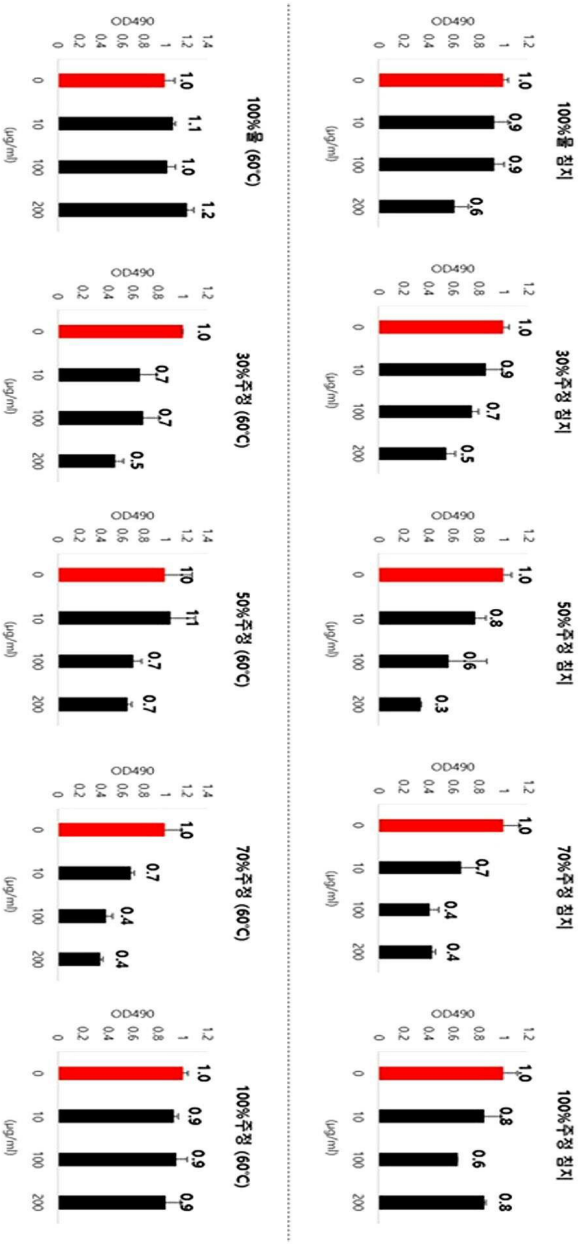
[0161] 본 발명의 추출물 100 mL를 토마토 또는 당근 주스 1,000 mL에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0163] **<3-3> 과일 주스의 제조**

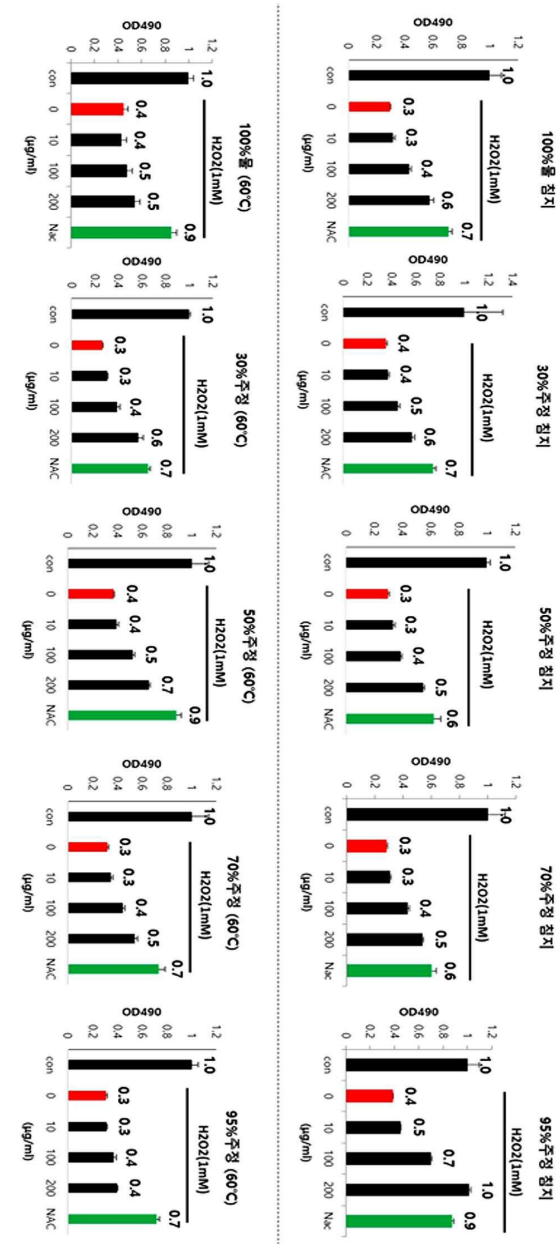
[0164] 본 발명의 추출물 100 mL를 사과 또는 포도 주스 1,000 mL에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

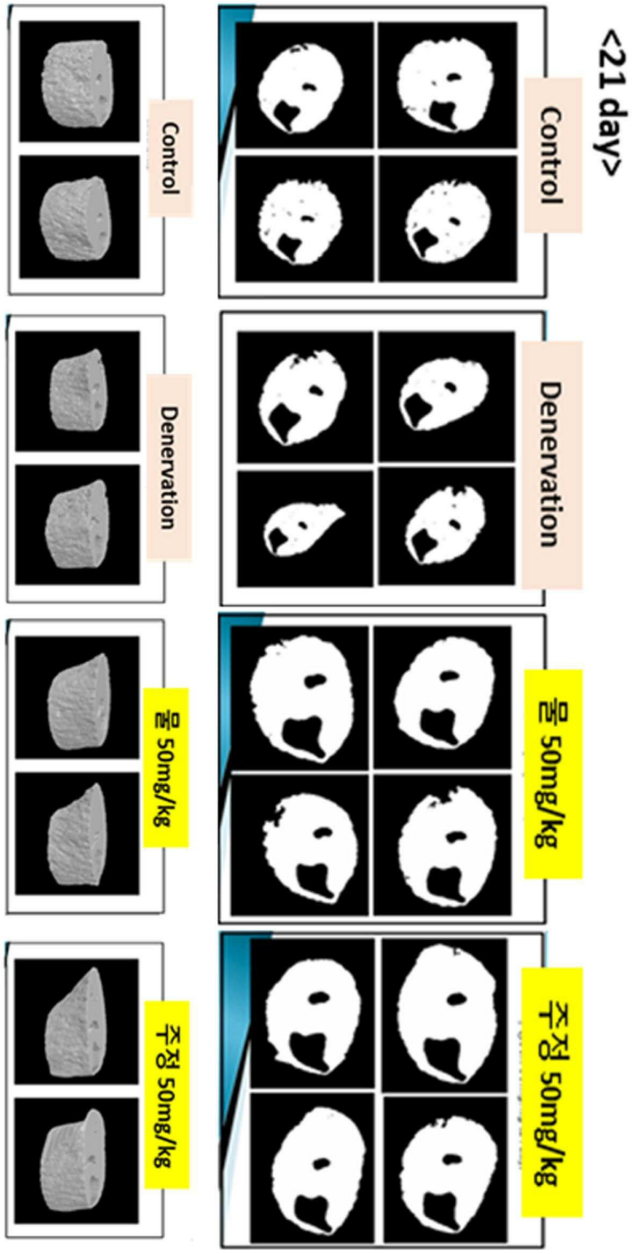
도면1


100%물 침지
30%주정 침지
50%주정 침지
70%주정 침지
100%주정 침지
100%물 (60℃)
30%주정 (60℃)
50%주정 (60℃)
70%주정 (60℃)
100%주정 (60℃)
OD490
(μg/ml)

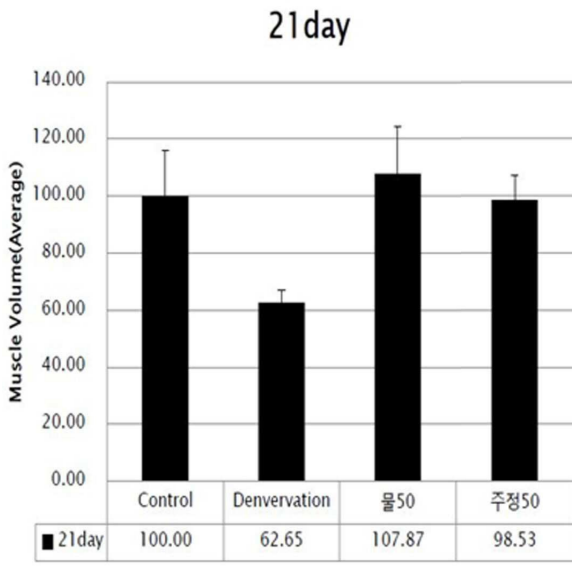
도면2


100%물 침지
30%주정 침지
50%주정 침지
70%주정 침지
95%주정 침지
100%물 (60℃)
30%주정 (60℃)
50%주정 (60℃)
70%주정 (60℃)
95%주정 (60℃)
OD490
H2O2(1mM)
(μg/ml)
con
0
10
100
200
NAC
Nac

도면3a


<21 day>
Control
Denervation
물 50mg/kg
주정 50mg/kg
Control
Denervation
물 50mg/kg
주정 50mg/kg

도면3b


21day
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
Muscle Volume(Average)
Control
Denervation
물50
주정50
21day
100.00
62.65
107.87
98.53