



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0116219

(43) 공개일자

2012년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/344 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2011-0033826

(22) 출원일자

2011년04월12일

심사청구일자

2011년04월12일

기술이전 희망 : , 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

강일준

강원도 춘천시 퇴계로 168, 주공2차 아파트 209동 403호 (퇴계동)

최신옥

강원도 춘천시 공지로 43, 102동 1206호 (석사동, 극동아파트)

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 생더덕 및 찐더덕 추출물을 이용한 지방 생성 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 식품소재인 더덕으로부터 추출물 및 분획물을 획득하고 지방전구세포인 3T3-L1 세포에 처리한 결과, 생더덕과 찐더덕을 처리했을 때 지방의 분화가 저해되는 것을 확인하고, 그에 따른 단백질과 mRNA의 발현 역시 저해되는 것을 확보하여 이를 토대로 본 발명을 완성하게 되었다.

(72) 발명자

김현주

강원도 춘천시 교동길 76-1, 208호 (교동)

김안나

강원도 춘천시 후만로 119, 4동 204호 (후평동, 금호빌리지)

전영은

강원도 춘천시 후평동 극동아파트 101-803

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C7211-1001-0020

부처명 지식경제부

연구사업명 이공계 전문가 기술지원서포터즈사업

연구과제명 항비만 소재개발 및 건강기능식품 제품화 기술지원

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

생더덕(The raw Codonopsis lanceolata) 및 찐더덕(The steamed Codonopsis lanceolata) 추출물을 이용한 지방 생성 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 것을 특징으로 하는 지방 생성 억제용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 알코올은 C₁ 내지 C₄ 저급 알코올인 것을 특징으로 하는 지방 생성 억제용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올 인 것을 특징으로하는 지방 생성 억제용 조성물.

청구항 5

제 1항의 더덕추출을 추가적으로 유기용매로 추출하여 제조된 유기용매 분획물을 이용한 지방 생성 억제용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 유기용매는 헥산, 메틸렌클로로라이드, 에틸아세테이트로 및 부탄올 등인 것을 특징으로 하는 지방 생성 억제용 조성물.

청구항 7

생더덕 및 찐더덕 추출물을 이용한 지방 생성 억제용 건강기능식품.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 것을 특징으로 하는 지방 생성 억제용 건강기능식품.

청구항 9

제 7항의 더덕추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 제조된 유기용매 분획물을 이용한 지방 생성 억제용 건강기능식품

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 유기용매는 헥산, 메틸렌클로로라이드, 에틸아세테이트로 및 부탄올 등인 것을 특징으로 하는 지방 생성 억제용 건강기능식품.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 생더덕, 찐더덕 추출물을 유효성분으로 함유하는 지방생성 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만은 유전적 원인 또는 생활습관상의 원인에 의한 체내 지방의 과잉축적 상태를 말하며, 성인병, 만성퇴행성 질환 등의 질병을 유발하여 선진국의 경우 총 국민의료비의 2~7%가 과체중 및 비만에 의해 발생하고 있다. (보건복지부, 2006 비만 심포지움 자료)

- [0003] 비만은 단순히 미용의 문제가 아니라 심각한 합병증을 초래할 수 있으며 여러 가지 수많은 건강상의 문제들을 야기할 수 있는, 장기적인 치료와 관찰을 요구하는 만성질환이다. 이는 다만 서구사회의 문제만이 아니라 우리나라를 포함한 여러 아시아 국가들에서도 유행병처럼 급증하고 있는 심각한 보건문제의 하나이다. 우리나라의 경우 체질량 지수 25 kg/m²이상의 비만 인구의 비율이 1995년 국민건강 영양조사 당시 13.9% 였던 것이 2001년 30.6%로 매우 빠른 속도로 급증하고 있다. (비만, 만병의 바로미터, 대한비만학회지, 2010, April)
- [0004] 인체를 구성하고 있는 기관 중 가장 큰 기관인 피부는 표피, 진피 및 피하지방층으로 구성되어 있다. 진피 아래의 피하지방층은 지방세포 (adipocyte)로 구성되어서 외부의 열이나 충격에 대해 피부 내부의 기관의 보호하는 역할을 하며, 영양성분을 트리아실글리세롤의 형태로 저장하여 에너지원으로 사용하기도 한다.
- [0005] 그러나, 피부 미용적인 측면에서 볼 때 피하지방층은 비만의 원인이 된다. 특히, 셀룰라이트라고 하여 특정 부위에 지방 성분이 과도하게 축적됨으로 인해 얼굴, 허리, 허벅지, 가슴 등 특정 부위에 피부가 처지게 되어 탄력이 떨어지게 되고 비만 등과 같은 현상이 유발되기도 한다.
- [0006] 웰빙(well-being)의 붐과 함께 삶의 질에 대한 관심 증가로 건강과 미를 동시에 추구하고자 하는 경향이 높아짐에 따라 비만에 대한 미용적 측면이 부각되었으며, 국소적 지방 감량이나 셀룰라이트 관리를 위한 슬리밍, 아로마 약물 및 식이요법 등이 대중에게 손쉽게 이용되고 있는 실정이다. (The lifestyle Drug Outlook to 2007, Reuters, KISTI 재구성)
- [0007] 지방 생성 억제 효능에 관한 연구는 주로 3T3-L1 지방 전구 세포에 대하여 진행되고 있으며, 3T3-L1에 지방세포로 분화를 유도하는 인자를 처리하여 지방 생성 억제 효능 평가에 사용한다. 지방 분화는 여러 가지 양성 조절자에 의해서 일어나게 되는데, 이때 관련 양성 조절자로는 C/EBPa와 SREBP1등이 있다. C/EBPa는 CCAAT 인헨서에 붙는 단백질로서 cAMP에 의해 발현이 증가되어 지방세포 분화 시에 활성화 되어 지방 분화 시기에 따라 다양한 동형체가 발현되는 것으로 알려져 있다. SREBP1도 역시 지방분화와 함께 증가하며 다양한 지방대사 관련 유전자인 Lipoprotein lipase, Fatty acid synthase, leptin, adiponectin 등의 발현을 증가시킨다. 이러한 양성 조절자의 역할에 의해 지방이 생성이 조절되는 것이다.
- [0008] 최근 체내 지방 분해 촉진을 위한 많은 성분들이 개발되고 있다. 이 중에 가장 많이 사용되는 것이 카페인(caffeine)이다. 카페인은 지방 분해와 관련된 효소인 아데닐레이스(adenylate cyclase)의 촉진시킨다고 알려져 있다. 이렇듯 많은 제품들이 카페인을 기본 성분으로 하고 있으며, 여기에 열량 소모를 높여주기 위해 고추의 캡사이신 성분과 L-카르니틴 등이 사용되고 있다.
- [0009] 많은 관심을 보였던 비엔씨에서 출시한 핫버닝 젤에도 역시 카페인과 캡사이신을 주요 성분으로 하여 제품을 출시하였으며, 로레알에서 출시한 슬리밍 제품도 역시 카페인을 기본 성분으로 하고 있는 것을 알 수 있다.
- [0010] 하지만 카페인은 중독성 물질이라는 안 좋은 인식과 기관지 확장을 유도하거나, 월경 전 증후군 현상을 악화시키는 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있어서 이들의 효능과 안전성이 의심되고 있다. 이와 같은 부작용은 대중들의 의심과 두려움을 높여주고 있다. 그러므로 보다 안전하고 효능이 우수한 천연 기능성 소재 개발이 요구되고 있는 실정이다. (Caffeine and the Student Body, Research conducted by BC Community Nutritionists Council, School Food Advisory Committee)
- [0011] 최근에는 이런 추세에 따라 클라란스에서는 HD바디리프트라는 제품으로 블루 버튼 플라워를 중심으로 자연에서 추출한 8가지 성분을 내세워 좋은 반응을 얻고 있으며, 해초 성분을 중심으로 하여 SAMPAR에서도 제품을 출시하고 있다. 이처럼 천연 기능성 소재에 대한 관심이 높아지고 있으며 대중들의 선호도 또한 높아지고 있다.
- [0012] 천연 기능성 소재의 개발은 슬리밍 효능 화장품뿐만 아니라 항비만 효능과 연계하여 의약품 혹은 다이어트 식품류 등과 연계하여 보다 안전하고 우수한 효능의 제품 개발이 가능할 것으로 사료된다.
- [0013] 더덕(沙蔞, *Codonopsis lanceolata* traut)은 한국, 중국 및 일본의 산간지방에서 야생하는 초롱꽃과의 다년생 초본으로서 도라지와 함께 일반 식용으로 널리 이용되고 있는 산채식품이다(Maeng and Park, 1991). 식품 의약품 안전청의 식품공전 원재료 분류에서 야생식물류로 분류되어 주원료인 뿌리는 식용이 가능하며 한방에서는 인삼대용 생약으로 쓰인다. 더덕은 기호식품으로도 상당한 호평을 받는 식품일 뿐 아니라 중요한 건강식품으로 애용되어왔으며 한방에서는 강장제, 진해, 거담제등으로서 인삼 대용 생약으로 사용되고 있다(Maeng and Park, 1990).
- [0014] 더덕의 성분에 관해서는 일종의 사포닌이 존재한다는 것이 확인 되었으며(Kim et al., 1975), 더덕으로부터 terpenoid 성분들을 분리 동정한 결과squalene의 cyclic product인 cycloartenol임을 밝혀보고 되었다. 또,

1974년에 한국산 더덕 중의 glucoside를 분리하고 그 aglycone을 동정하였다. 더덕은 뿌리에 사포닌이 많은 것이 특색이며 물에 잘 녹고 거품이 일어나는 물질이다. 사포닌이란 식물계에 널리 존재하는 배당체에서 당이 아닌 부분이 여러 고리화합물로 이루어진 것을 말한다. 더덕의 사포닌은 기침을 멎게 하고 가래를 삭이는 효과가 있다. 그래서 기관지염, 편도선염, 인후염 등 호흡기질환에 좋은 식품으로 인정받고 있다. 감기로 인해 열이 나고 갈증이 심해 물을 자주 마시는 경우에도 도움이 된다. 위, 폐, 비장, 신장 등 내장기관을 튼튼히 하고 피로를 없애는 강장효과 뿐 아니라 여성의 월경불순, 피부미용에 탁월한 효과가 있으며 모유분비를 촉진시키는 효과가 있다.(Young Hee Kim, Antioxidant Activity of saponin from Dodok, 상명대학교 공학기술 연구소)

[0015] 한편, 수증기로 찌는 과정을 거친 천연 추출물의 경우에는 인체에 유해한 유기용매를 사용하지 않고 천연물 내의 유효성분 함량 추출율을 증가시키고 활성화된 유효성분에 의해 우수한 피부 효능이 기대되고 있다.

[0016] 특히 인삼을 보면 발효 인삼, 홍삼, 백삼 등 가공하는 방법에 따라 다양하게 이용되고 있으며, 이런 과정을 거침으로 인삼에는 존재하지 않는 사포닌의 생성 및 사포닌 성분의 증가 등의 다양한 효능을 얻는 것으로 보고되고 있다. 이처럼 찢더덕은 생더덕에 비해 다양한 효능을 얻을 수 있으며, 같은 천연 추출물이라도 다른 기능을 얻을 수 있을 것이라고 사료된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명은 지방 생성을 억제 효능이 우수하고 비자극성인 지방 생성 억제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에서는 생더덕과 찢더덕에서 추출한 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 지방 생성 억제 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에서는 생더덕과 찢더덕에서 추출한 추출물을 지방전구세포인 3T3-L1 세포에 처리한 결과, 생더덕과 찢더덕을 처리했을 때 지방의 분화가 저해되는 것을 확인하고, 그에 따른 단백질과 mRNA의 발현 역시 저해되는 것을 확보하여 이를 토대로 본 발명을 완성하게 되었다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 생더덕과 찢더덕의 추출물은 천연물에서 유래한 지방 생성 억제 조성물이라는 측면에서 그 의의가 있으며 이를 적극적으로 활용할 경우 다양한 질병에 대한 조성물로서 널리 활용될 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 지방 생성을 억제 효능이 우수하고 비자극성인 지방 생성 억제 조성물로 화장품, 식품, 의약품등 다양하게 첨가하여 사용할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하고자 한다. 단, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니며, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0023] 실시예

[0024] 실시예 1. 생더덕과 찢더덕 제조

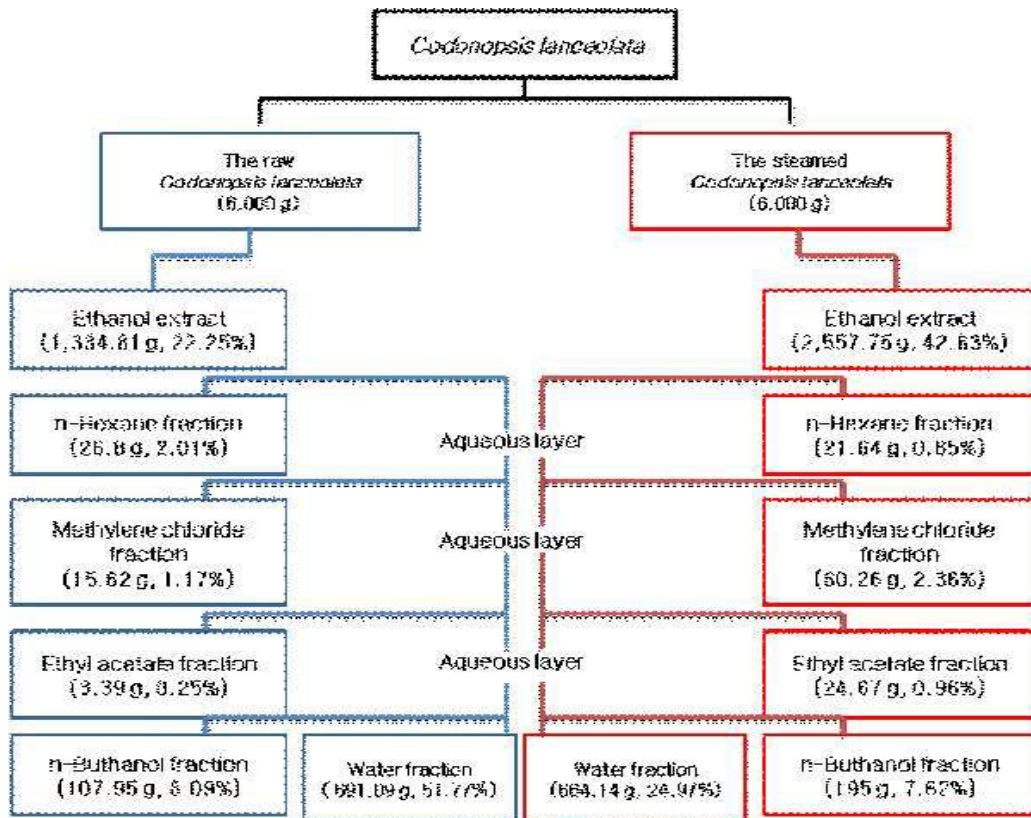
[0025] 본 실험재료는 2010년 신정상회(강원도 홍천군)에서 말린 더덕을 구매하여 생더덕의 시료로 사용하였고, 찢더덕은 생더덕을 깨끗이 수세하여 열풍건조기 60℃에서 3 시간 건조한 뒤 105℃에서 3시간 autoclave하였다. 이 과정을 3번 반복하였으며, 열풍건조기에 60℃에서 완전히 건조하여 찢더덕 시료로 사용하였다.

[0026] 실시예 2. 생더덕과 찢더덕 추출물 제조

[0027] 생더덕과 찢더덕 각 6 kg에 70% 에탄올을 첨가 후, 70℃에서 2시간씩 3회 반복 온침추출하였고, Whatman filter No2.로 여과하였다. 여과액을 감압농축기로 용매를 제거한 후 동결건조하여 최종의 생더덕(1,334.81 g, 22.25%)과 찢더덕 (2,557.75 g, 42.63%)의 70% 에탄올 추출물을 얻었다.

[0028] 실시예 3. 생더덕과 찢더덕 분획물 제조

[0029] 70% 에탄올을 추출하여 얻은 생더덕과 찢더덕은 증류수에 혼합시켜 동량의 n-Hexane(Hex)을 가하여 충분히 흔들어진 후, 일정시간 분리시켰다. 이 과정을 3회 이상 반복하여 얻은 Hex층을 여과한 후 감압하여 최종 Hex 분획물을 얻었다. 이와 같이 비극성에서 극성용매순으로 methylene chloride(MC), ethyl acetate(EtOAc), n-Buthanol(BuOH), water로 순차 분획하여 최종 분획물을 얻었다. 생더덕은 Hex분획물(26.8 g, 22.25%), MC분획물(15.62 g, 1.17%), EtOAc분획물(3.39 g, 0.25%), BuOH분획물(107.95 g, 8.09%), Water분획물(691.09 g, 51.77%)을 얻었다. 찢더덕은 Hex분획물(21.64 g, 0.85%), MC분획물(60.26 g, 2.36%), EtOAc분획물(24.67 g, 0.96%), BuOH분획물(195 g, 7.62%), Water분획물(664.14 g, 25.97%)을 얻었다.



[0030] 그림 1. 생더덕과 찢더덕 추출물 및 분획물 수율
[0031]

[0032] 시험예 1. 세포 독성 평가능

[0033] 실시예 1, 2, 3에서 제조한 생더덕과 찢더덕의 추출물에 대한 세포 독성 평가능을 MTT assay를 통해서 평가하였다.

[0034] 지방 전구 세포인 3T3-L1 세포를 96웰 플레이트의 각 웰에 1×10^5 /cells의 농도로 배양해준 후, 실시예 1, 2, 3에서 제조한 생더덕과 찢더덕의 추출물을 96 웰 플레이트의 각 웰에 10, 20, 50, 100, 200 μ g/mL의 농도로 100 μ L씩 넣은 후 24시간 배양하였다. 24시간 후 각 웰에 5 mg/mL의 농도로 PBS에 희석된 MTT용액을 20 μ L씩 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 isopropanol 100 μ L로 용출시켜 ELISA reader (VICTOR3, Perkin Elmer)를 이용하여 570nm에서 흡광을 측정하였다. 이때 대조군으로는 추출물 대신 DMSO를 사용하였다.

[0035] 상기 실험군과 대조군에 대한 흡광을 측정 후, 세포 독성 평가능을 환산하여 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	세포 생존율(%)
대조군	100 $\pm$ 1.1

생더덕 70% EtOH ex.	10 μ g/mL	106.3 $\pm$ 0.7
	20 μ g/mL	102.0 $\pm$ 1.4
	50 μ g/mL	89.0 $\pm$ 3.7
	100 μ g/mL	78.7 $\pm$ 2.5
	200 μ g/mL	93.8 $\pm$ 10.5
생더덕 Hex fr.	10 μ g/mL	113.9 $\pm$ 4.2
	20 μ g/mL	122.0 $\pm$ 9.1
	50 μ g/mL	169.4 $\pm$ 9.6
	100 μ g/mL	130.6 $\pm$ 11.5
	200 μ g/mL	136.1 $\pm$ 14.8
생더덕 MC fr	10 μ g/mL	90.6 $\pm$ 7.9
	20 μ g/mL	103.1 $\pm$ 0.6
	50 μ g/mL	96.9 $\pm$ 9.6
	100 μ g/mL	145.3 $\pm$ 10.2
	200 μ g/mL	153.1 $\pm$ 17.9
생더덕 EA fr	10 μ g/mL	85.6 $\pm$ 2.8
	20 μ g/mL	92.1 $\pm$ 3.3
	50 μ g/mL	120.4 $\pm$ 2.0
	100 μ g/mL	160.9 $\pm$ 1.7
	200 μ g/mL	196.6 $\pm$ 11.8
생더덕 BuOH fr.	10 μ g/mL	88.5 $\pm$ 3.5
	20 μ g/mL	80.2 $\pm$ 6.7
	50 μ g/mL	82.1 $\pm$ 3.1
	100 μ g/mL	81.0 $\pm$ 4.8
	200 μ g/mL	33.5 $\pm$ 3.9
생더덕 Water fr.	10 μ g/mL	93.9 $\pm$ 6.1
	20 μ g/mL	85.1 $\pm$ 9.6
	50 μ g/mL	96.7 $\pm$ 16.5
	100 μ g/mL	78.9 $\pm$ 10.4
	200 μ g/mL	86.3 $\pm$ 4.6
구분		세포 생존율(%)
대조군		
찔더덕 70% EtOH ex.	10 μ g/mL	87.6 $\pm$ 1.1
	20 μ g/mL	80.7 $\pm$ 4.5
	50 μ g/mL	81.7 $\pm$ 3.6
	100 μ g/mL	95.8 $\pm$ 5.2
	200 μ g/mL	105.4 $\pm$ 0.6
찔더덕 Hex fr.	10 μ g/mL	82.9 $\pm$ 5.0
	20 μ g/mL	93.5 $\pm$ 6.0
	50 μ g/mL	102.4 $\pm$ 9.6
	100 μ g/mL	122.4 $\pm$ 11.5
	200 μ g/mL	227.3 $\pm$ 14.8
찔더덕 MC fr	10 μ g/mL	82.5 $\pm$ 6.7
	20 μ g/mL	76.5 $\pm$ 3.3
	50 μ g/mL	71.7 $\pm$ 5.9
	100 μ g/mL	90.8 $\pm$ 5.4
	200 μ g/mL	168.6 $\pm$ 16.6
찔더덕 EA fr	10 μ g/mL	93.3 $\pm$ 10.5
	20 μ g/mL	80.5 $\pm$ 10.4
	50 μ g/mL	81.7 $\pm$ 4.8
	100 μ g/mL	114.3 $\pm$ 12.8
	200 μ g/mL	139.9 $\pm$ 17.8
찔더덕 BuOH fr.	10 μ g/mL	87.2 $\pm$ 4.1
	20 μ g/mL	94.0 $\pm$ 3.5
	50 μ g/mL	96.9 $\pm$ 0.9
	100 μ g/mL	87.8 $\pm$ 2.1
	200 μ g/mL	81.1 $\pm$ 0.8

췌터덕 Water fr.	10 μ g/mL	93.4 $\pm$ 3.2
	20 μ g/mL	86.0 $\pm$ 1.8
	50 μ g/mL	87.6 $\pm$ 4.2
	100 μ g/mL	78.6 $\pm$ 2.1
	200 μ g/mL	81.9 $\pm$ 4.8

[0037] 위 표 1에서 보는 바와 같이, 실시예 1, 2, 3에서 제조한 생터덕과 췌터덕 추출물은 생터덕의 BuOH fr.과 췌터덕 MC fr.과 고농도를 제외하고는 세포 독성을 보이지 않는 것을 확인하였다.

[0038] 시험예 2. 지방 분화 억제율 확인(Oil Red O staining)

[0039] 상기 실시예 1, 2, 3에서 제조한 생터덕과 췌터덕 추출물은 시험예 1을 통해서 세포에 알맞은 농도를 확인하였고 독성이 크지 않음을 확인하였다. 다음으로 상기 추출물을 분획별로 확인하여 지방 분해 억제율을 확인하였다.

[0040] 지방 전구세포 3T3-L1 세포를 6-well plate에 3×10^5 cells/mL의 농도로 희석하여 1 mL씩 접종한 후 MDI 배지(100 μ M IBMX + 250nM dexamethasone + 10 μ g/mL insulin)로 분화를 유도한 후 시료를 처리한 후 각 웰에 4% paraformaldehyde를 1 mL씩 접종하여 배양하고 1시간 이상 배양하였다. 그 후 60% isopropanol을 이용하여 세척하고 각 웰이 완전히 마른 후에 Oil Red O working solution을 첨가하고 10분간 방치하였다. 10분 후 Oil Red O working solution을 제거하고 물을 모두 제거하고 말려준 후 100% isopropanol을 가하여 용출시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 500nm에서 흡광을 측정하였다. 이때 대조군으로는 추출물 대신 DMSO를 사용하였다.

표 2

[0041]

구분		지방 분화율(%)
대조군		100.0
생터덕 70% EtOH ex.	10 μ g/mL	116.9
	50 μ g/mL	118.8
	100 μ g/mL	120.1
생터덕 Hex fr.	10 μ g/mL	92.2
	50 μ g/mL	95.7
	100 μ g/mL	92.3
생터덕 MC fr	10 μ g/mL	79.8
	50 μ g/mL	95.0
	100 μ g/mL	93.3
생터덕 EA fr	10 μ g/mL	86.1
	50 μ g/mL	94.3
	100 μ g/mL	89.6
생터덕 BuOH fr.	10 μ g/mL	95.7
	50 μ g/mL	47.4
	100 μ g/mL	19.9
췌터덕 Water fr.	10 μ g/mL	95.0
	50 μ g/mL	96.9
	100 μ g/mL	88.8

표 3

[0042]

구분		지방 분화율(%)
대조군		100.0
췌터덕 70% EtOH ex.	10 μ g/mL	62.3
	50 μ g/mL	73.6
	100 μ g/mL	68.3
췌터덕 Hex fr.	10 μ g/mL	105.5
	50 μ g/mL	106.3
	100 μ g/mL	82.6

쥘더덕 MC fr	10 μ g/mL	83.6
	50 μ g/mL	80.0
	100 μ g/mL	67.4
쥘더덕 EA fr	10 μ g/mL	72.7
	50 μ g/mL	44.8
	100 μ g/mL	16.2
쥘더덕 BuOH fr.	10 μ g/mL	99.5
	50 μ g/mL	97.6
	100 μ g/mL	72.8
쥘더덕 Water fr.	10 μ g/mL	62.3
	50 μ g/mL	73.6
	100 μ g/mL	68.3

[0043] 위 표 2와 표 3에서 보는 바와 같이, 실시예 1, 2, 3에서 제조한 쥘더덕과 쥘더덕 추출물 중에 두 개의 BuOH층에서 지방 생성 억제 효능을 보이는 것을 확인하였다.

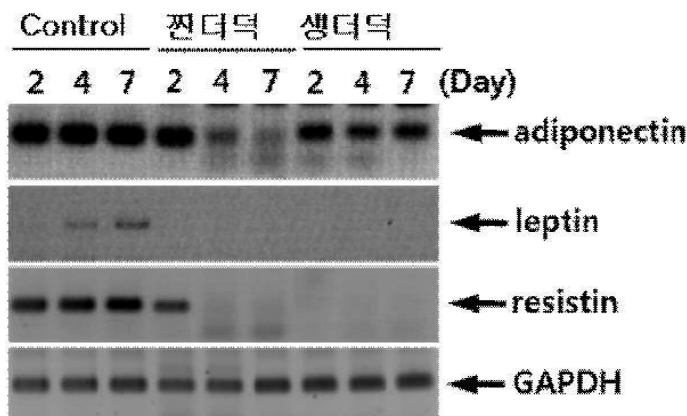
[0044] 시험예 3. mRNA 발현 확인

[0045] 상기 시험을 통해 확인한 결과를 토대로 지방 생성에 관여하는 인자들의 발현을 확인하기 위해 다음으로 RT-PCR을 통한 mRNA의 발현을 확인하였다.

[0046] 지방 전구 세포인 3T3-L1 세포를 60mm 플레이트에 3×10^5 /cells의 농도로 배양해준 후 지방 분화 인자를 넣어서 지방 분화를 유도하여 준 후, 실시예 1, 2, 3에서 제조한 쥘더덕과 쥘더덕의 추출물 BuOH층을 60mm 플레이트의 각 웰에 100 μ g/mL의 농도로 넣은 후 0, 2, 4, 7일간 배양하였다. 이때 대조군으로는 추출물 대신 DMSO를 사용하였다.

[0047] 플레이트의 세포에서 RNA를 추출한 후 cDNA를 제작한 후, 지방 생성에 관여하는 인자들의 프라이머를 제작하여 PCR을 이용하여 mRNA의 발현을 확인하였다.

[0048] <그림 1>



[0050] 위 그림 1에서 보는 바와 같이, 실시예 1, 2, 3에서 제조한 쥘더덕과 쥘더덕 추출물의 BuOH층은 지방 생성에 필요한 인자들의 발현을 mRNA수준에서 저해시키는 것을 확인하였다.

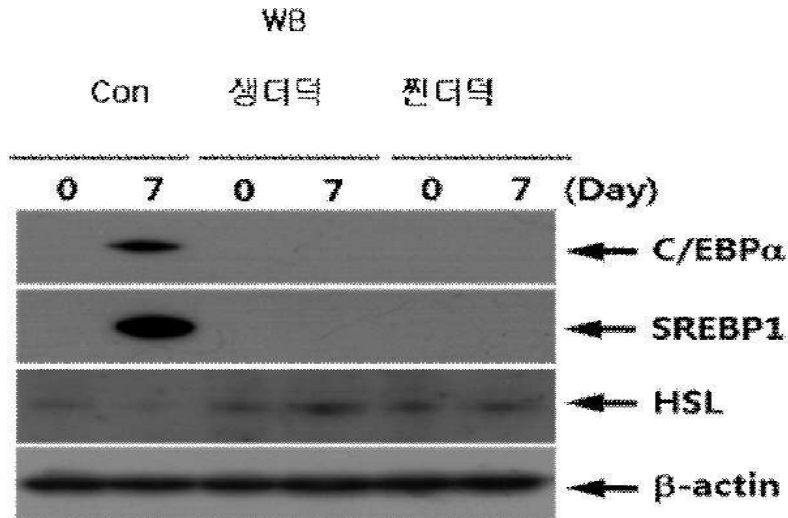
[0051] 시험예 4. 단백질 발현 확인

[0052] 상기 시험을 통해 확인한 결과를 토대로 지방 생성에 관여하는 인자들의 발현을 확인하기 위해 다음으로 western blot을 통한 단백질의 발현을 확인하였다.

[0053] 지방 전구 세포인 3T3-L1 세포를 60mm 플레이트에 3×10^5 /cells의 농도로 배양해준 후 지방 분화 인자를 넣어서 지방 분화를 유도하여 준 후, 실시예 1, 2, 3에서 제조한 쥘더덕과 쥘더덕의 추출물 BuOH층을 60mm 플레이트의 각 웰에 100 μ g/mL의 농도로 넣은 후 0, 2, 4, 7일간 배양하였다. 이때 대조군으로는 추출물 대신 DMSO를 사용하였다.

[0054] 플레이트의 세포에서 단백질을 추출한 후 SDS-Page 전기영동을 통해 지방 생성에 관여하는 인자들의 항체와 반응시켜 단백질의 발현을 확인하였다.

[0055] <그림2>



[0056]

[0057] 위 그림 2에서 보는 바와 같이, 실시예 1, 2, 3에서 제조한 생더덕과 찐더덕 추출물의 BuOH층은 지방 생성에 필요한 인자들의 단백질 수준에서 발현을 저해시키는 것을 확인하였다. 또한, Hormone-sensitive lipase (HSL)의 경우에는 지방세포의 분화가 진행될수록 발현이 감소되어 triglyceride의 형성이 증가하는데, 생더덕과 찐더덕을 처리한 시험군에서는 미미하지만 HSL단백질의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다.

[0058] 이상 종합하면, 본 발명의 더덕 추출물은 지방 분화를 저해함으로써 지방 생성을 저해하거나 억제하는 효과를 가짐을 알 수 있다. 또한, 생더덕과 찐더덕의 추출물의 BuOH층에서 효과를 보였고, 생더덕 보다 찐더덕의 효과가 더 좋은 것을 확인하였다. 이는 생더덕과 찐더덕 간의 성분의 차이가 있을 것으로 사료되며, KT&G에서 낸 특허에 보면 사포닌 물질이 지방생성을 억제한다는 효능이 있다는 특허가 있기 때문에 그것을 적용해 볼 때, 사포닌이 유효성분으로 작용한 것으로 보인다.