(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0111335
(43) 공개일자 2007년11월21일

(51) Int. Cl.
A61K 36/258 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0044633(분할)
(22) 출원일자 2007년05월08일
심사청구일자 2007년05월08일
(62) 원출원 특허 10-2006-0044066
원출원일자 2006년05월17일
심사청구일자 2006년05월17일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
송규용
대전 유성구 궁동 충남대학교 약학과
신현중
서울 강남구 압구정동 신현대아파트 115동 1308호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

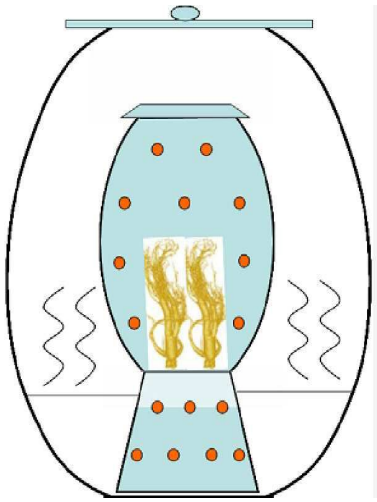
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 신규한 흑삼의 추출물을 함유하는 약학조성물

(57) 요 약

본 발명은 인삼을 세척하여 적정 온도 및 시간으로 건조 및 증숙을 반복하는 공정을 통하여 기존의 구증구폭의 방법으로 제조된 흑삼에 비하여 시간이 단축되며, 대량생산이 가능한 항암활성을 갖는 흑삼을 제조하는 방법에 관한 것으로, 이로부터 제조된 흑삼 및 이의 추출물은 뛰어난 항암 효과를 나타내어 암질환의 예방 및 치료를 위한 조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

서영배

대전 서구 삼천동 991 국화아파트 105동 601호

이지현

대전 유성구 장대동 306-9 트윈스빌 A동 202동

명창선

경기 과천시 별양동 주공아파트 637동 102호

오한진

서울 강남구 대치동 은마 아파트 10동 705호

박용진

대전광역시 서구 둔산동 988 백남빌딩

특허청구의 범위

청구항 1

4 내지 6년근 수삼을 세척 후, 35 내지 55℃의 온도에서 20 내지 28시간 동안 건조시키는 1차 건조공정; 옹기에 넣어 85 내지 105℃의 온도에서 5 내지 7시간 동안 증숙하는 1차 증숙공정; 50 내지 70℃의 온도에서 9 내지 15시간 동안 건조시키는 2차 건조공정; 95 내지 125℃의 온도에서 5 내지 7시간 동안 증숙하는 2차 증숙공정; 12시간 동안 건조하는 3차 건조공정 단계를 통하여 제조된 흑삼을 분쇄하여 흑삼 질량의 3 내지 7배의 물을 가하여 3 내지 7시간동안 방치하고, 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매로 추출한 흑삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 유방암, 폐암, 섬유육종암 또는 간암의 예방 및 치료용 약학조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<2> 본 발명의 목적은 기존의 구증구폭의 방법으로 제조된 흑삼에 비하여 시간이 단축되며, 대량생산이 가능하고, 항암 효과를 나타내는 신규한 흑삼의 제조방법 및 이를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

<3> 35억 달러 세계 인삼시장을 잡기 위하여 국내 바이오 벤처기업들이 연간 35억 달러에 달하는 세계 인삼 관련 신 물질 개발에 열을 올리고 있다. 지금까지 인삼을 기능성식품으로 표준화 해 세계 시장에서 성과를 올리고 있는 기업은 스위스 베링거잉겔하임 산하의 "파머톤사" 뿐이며 국내에서도 인삼에 대한 국가차원의 연구와 벤처업계의 상품화가 속속 진행되고 있다.

<4> 우리나라의 홍삼은 약 1,000년 전부터 제조된 역사적 기록을 가지고 있으며(중국 송나라의 서긍이 저술한 고려도경에 홍삼에 대한 기록이 있음), 한의학적 전통제약기술인 수치법에 의해 가공제조된 수치생약이라 할 수 있다. 일반적으로 생약의 수치목적은 1) 독성 등 부작용의 경감, 2) 생약 성능의 개변과 약효의 증강, 3) 보관이나 저장성의 향상, 4) 맛과 냄새 교정 및 부색 등으로 알려지고 있다. 일반적으로 홍삼은 적정한 열처리 공정을 거치는 동안 2차적 성분변환이 일어나 수삼(fresh ginseng)이나 백삼에 존재하지 않는 홍삼 특유의 새로운 약효성분들이 생성되기도 하고, 어떤 활성성분은 함량 증가가 일어난다. 이렇듯 인삼의 가공방법에 따라 인삼에 존재하지 않는 새로운 성분이 생성되며 인삼에 비해서 항암작용을 비롯한 여러 가지 생리활성에 대해서 보다 우수한 효과를 나타내는 새로운 가공 인삼을 개발 할 수 있다(Okamura N. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 17(2), p.270, 1994).

<5> 중국의 경우 백삼에는 거의 존재하지 않으며 홍삼에 소량 존재하는 인삼 사포닌인 Rg3를 대량 생산하는 방법을 개발하여 'Shenyi' 라는 상품명으로 항암치료를 위해 사용하고 있다.

<6> 국내의 경우 기능성 인삼의 대표 제품은 지난 98년 바이오벤처기업 진생사이언스가 개발한 '선삼'으로써 지난 2001년 선삼정으로 개발돼 국내 건강기능성식품 시장에 본격 알려진 이후 국내는 물론 전 세계적인 발명품으로도 인정받으며 기능성 인삼의 선두주자로 자리매김 한 상태이다(Keum YS et al., Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng, *Cancer Lett.*, , 150(1), pp.41-48, 2000).

<7> 이밖에도 한국생명공학연구원과 바이오벤처기업 비티진이 공동 개발한 '황삼EX', ㈜남일농장 인삼영농조합이 바이오벤처기업인 ㈜그린바이오와 손잡고 제품화한 '팽화홍삼', 남양알로에서 분사한 ㈜유니젠은 최근 미국 UPI사와 공동으로 개발 한 `바이오맥스', (주)CJ의 '식스플러스', (주)일동제약의 '황삼' 다음과 같은 여러 종류의 가공인삼이 개발되고 있다.

<8> 이와 같이 프리미엄 인삼 시대를 맞이하여 본 발명자는 증숙법의 하나인 한약재의 가공방법 중 물과 불을 함께 사용하는 것으로 가장 대표적인 방법인 구증구폭(九蒸九曝)의 원리를 이용하여 제조되는 가공인삼인 흑삼의 제조방법에 비하여 시간적으로 매우 단축되고, 대량 생산이 가능한 표준화된 흑삼의 제조방법을 개발하였으며, 제조된 흑삼이 기존 구증구폭의 방법으로 제조된 흑삼과 동등한 수준의 인삼 사포닌을 함유하며, 뛰어난

항암 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<9> 본 발명의 목적은 기존의 흑삼 제조 방법보다 시간이 단축되고, 대량 생산이 가능한 흑삼의 신규한 제조방법 및 이를 포함하는 조성물을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<10> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수삼을 건조, 증숙, 가열 및 건조하는 공정을 통하여 시간이 단축되고, 대량 생산이 가능한 흑삼의 신규한 제조방법을 제공한다.

<11> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<12> 본 발명의 흑삼은 하기와 같이 제조될 수 있다.

<13> 본 발명의 3 내지 7년근, 바람직하게는 5년근 수삼을 세척 후, 20 내지 60℃, 바람직하게는 35 내지 55℃의 온도에서 12 내지 36시간, 바람직하게는 20 내지 28시간 건조하는 1차 건조공정; 용기에 넣어 예열시간을 제외하고 60 내지 120℃, 바람직하게는 85 내지 105℃의 온도에서 3 내지 9시간, 바람직하게는 5 내지 7시간 동안 증숙하는 1차 증숙공정; 40 내지 80℃, 바람직하게는 50 내지 70℃의 온도에서 6 내지 18시간, 바람직하게는 9 내지 15시간 동안 건조시키는 2차 건조공정; 85 내지 135℃, 바람직하게는 95 내지 125℃의 온도에서 3 내지 9시간, 바람직하게는 5 내지 7시간 동안 증숙하는 2차 증숙공정; 8 내지 16시간, 바람직하게는 10 내지 14시간 동안 건조하는 3차 건조공정을 포함함을 특징으로 하는, 시간이 단축되고, 대량 생산이 가능한 흑삼을 제조하는 방법을 제공한다.

<14> 상기 흑삼 제조방법은 종래 흑삼 제조방법으로 알려진 대한민국 특허등록 제10-0529475호 및 대한민국 특허등록 제 10-0543862호에 기재된 제조 방법에 의해 제조된 흑삼의 성분과 비교했을 때, 기존의 구증구폭의 원리를 이용하여 제조된 흑삼과 동등 또는 우수한 수준으로 인삼 사포닌이 존재하며, 기존 방법으로 제조된 흑삼보다 시간이 단축되고, 대량 생산이 가능함을 특징으로 한다.

<15> 상기 제조 방법에 의해 제조된 흑삼 또는 그 추출물은 음건, 냉동건조 등의 당업계에 통상적인 건조방법을 통하여 건조한 후, 미세입자, 바람직하게는 약 50㎛ 내지 200㎛의 입자크기로 분쇄, 분말화하는 공정을 통하여 당업계에 잘 알려진 부형제 또는 담체를 이용하여 환제, 캅셀제, 정제 등의 조성물로 제조할 수 있다.

<16> 상기 방법에 의해 제조된 흑삼은 생약 분쇄기를 이용하여 미세분말, 바람직하게는 약 50~200㎛ 크기의 분말로 분쇄하여 각종제제의 원료로 사용할 수 있다.

<17> 또한 상기 방법으로 제조된 흑삼의 추출물을 수득하는 방법을 자세히 설명하면, 상기 제조 방법으로 제조된 흑삼을 분쇄한 후, 흑삼의 약 3 내지 7배, 바람직하게는 4 내지 6배 질량의 물을 가하여, 실온에서 3 내지 7시간 방치한 후, 메탄올을 0.5 내지 2ℓ를 가하여, 3시간씩 3회 환류 추출하였다. 추출한 용액을 실온까지 냉각시킨 후 여과한 뒤 감압 농축기를 이용하여 메탄올을 제거하여 본 발명의 제조방법으로 제조된 흑삼의 추출물을 수득할 수 있다.

<18> 본 발명의 제조방법은 인삼 자체뿐만 아니라 인삼잎에도 적용될 수 있다. 인삼잎은 지금까지 약용으로 사용하지는 않고 그냥 버리거나 사료용으로 사용되었으며 일부가 향장품 또는 식품의 원료로 사용되어 왔을 뿐이나, 인삼잎 추출물을 본 발명에서와 같은 방법으로 가열, 가압처리 할 경우 약효가 훨씬 강화되므로 이제까지의 인삼잎의 용도에는 물론이고 약용으로도 사용될 수 있다.

<19> 상기 방법으로 제조된 흑삼은 기존의 수삼이나 백삼, 또는 홍삼에는 없거나, 극미량으로 존재하던 활성 성분의 함량을 증강시킴을 특징으로 한다.

<20> 또한, 본 발명의 제조방법으로 제조된 흑삼 추출물은 암세포주에서 강한 세포 독성을 나타내며, 홍삼 추출물에 비하여 강한 항암 효과를 나타냄을 특징으로 한다.

<21> 본 발명은 상기 제조방법 및 추출방법으로부터 제조되는 흑삼 및 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 암질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

<22> 본 발명의 암질환의 예방 및 치료용 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다.

<23> 본원에서 정의되는 암질환은 일반적인 암 질환을 포함하며, 바람직하게는 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로부터 선택된 암질환을 포함한다.

<24> 본 발명의 흑삼 및 이의 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<25> 본 발명의 흑삼 및 이의 추출물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

<26> 본 발명에 따른 흑삼 및 이의 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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 광물유를 들 수 있다. 제제화할 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 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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, 동결건조 제제, 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<27> 본 발명의 흑삼 및 이의 추출물의 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 0.2 내지 200㎎/kg으로, 바람직하게는 2 내지 100㎎/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.

<28> 본 발명의 흑삼 및 이의 추출물은 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.

<29> 본 발명의 제조방법으로 제조된 흑삼 및 흑삼 추출물은 기존의 인삼이 사용되어오던 용도, 즉 각종 의약품 제제, 한약, 건강식품, 식품, 차, 향장품 등에 원래 인삼보다 더 효능이 강화된 원료로 사용될 수 있다.

<30> 본 발명의 흑삼 및 이의 추출물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 또는 치료의 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

<31> 본 발명은 암질환의 예방 효과를 나타내는 상기 제조방법으로부터 얻어진 흑삼 및 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

<32> 상기 흑삼 및 이의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등이 있다.

<33> 또한, 암질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 흑삼 및 이의 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은

100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.

<34> 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 흑삼 및 이의 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 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 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

<35> 상기 외에 본 발명의 흑삼 및 이의 추출물은 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, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 추출물들은 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 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<36> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<37> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<38> **비교실시예 1. 홍삼 추출물의 제조**

<39> 홍삼 20g를 분쇄한 후 100㎖의 물을 가하여 실온에서 5시간 방치한 뒤 메탄올 1ℓ를 가하여 3시간 씩 3회 환류 추출하고, 추출한 용액을 실온까지 냉각시키고 여과한 뒤 감압 농축기를 이용하여 메탄올을 제거하여 홍삼 추출물 8.1g를 수득하였다. 홍삼 추출물 8.1g에 물 200㎖을 넣어 현탁시킨 후 에테르 200㎖을 가하여 비극성 물질을 제거하였다. 남아있는 수층에 수포화 부탄올 200㎖을 가하여 인삼에 존재하는 사포닌을 추출한 후 부탄올을 감압농축기로 제거하여 인삼 사포닌이 다량 함유된 부탄올 추출물 1.3g를 얻었다. 이 홍삼 조 사포닌을 발명의 비교 시료로 사용하였다.

<40> **실시예 1. 흑삼의 제조**

<41> 금산에서 생산되어 유통되는 5년근 수삼을 구입한 후 수삼을 스크류 세척기에 넣고 10분간 총 3회 반복해서 세척하였다. 이때 세척과정 중에 거피가 되지 않도록 주의하였다.

<42> 세척된 수삼을 건조하지 않고 증숙할 경우, 수삼이 터지는 경우가 많으므로 이를 방지하기 위하여 40℃에서 24시간 1차 건조하였다. 24시간 저온에서 말린 인삼을 증숙기로 사용한 옹기(도 1 참조)에 넣고 예열시간을 제외하고 95℃에서 6시간 1차 증숙하였다. 예열시간이라 함은 옹기에서 수증기가 세어 나오는 데까지의 시간으로 통상 30여분 소요되었다. 열선이 내장된 건조기의 내부온도를 60℃로 유지시킨 후 팬을 돌리면서 골고루 인삼을 12시간 동안 2차 건조시킨 후, 다시 115℃에서 6시간 2차 증숙한 후 건조기에서 12시간 3차 건조시켜 본 발명의 흑삼을 제조하였다.

<43> **실시예 2. 흑삼 추출물의 제조**

<44> 상기의 실시예 1의 방법으로 제조된 흑삼 20g를 취하여 분쇄한 후 100㎖의 물을 넣고 실온에서 5시간 방치한 뒤 메탄올 1리터를 넣고 3시간 씩 3회 환류 추출하였다. 추출한 용액을 실온까지 냉각시킨 후 여과한 뒤 감압농축기를 이용하여 메탄올을 제거하여 흑삼 추출물 7.4g를 수득하였다. 흑삼 추출물 7.4g에 물 200㎖을 넣어 현탁시킨 후 에테르 200㎖을 가하여 비극성 물질을 제거하였다. 남아있는 수층에 수포화 부탄올 200㎖을 가하여 인삼에 존재하는 사포닌을 추출한 후 부탄올을 감압농축기로 제거하여 인삼 사포닌이 다량 함유된 부탄올 추출물 1.4g를 얻었다. 이 흑삼 조 사포닌을 사포닌 성분 분석 및 항암 실험의 시료로 사용하였다.

<45>

<46> **실시예 3. 흑삼 사포닌 성분 분석**

<47> 흑삼 추출물에 존재하는 인삼사포닌의 성분을 분석하기 위하여 상기한 실시예 2에서 얻은 흑삼 부탄올

추출물 20mg을 메탄올 1mℓ에 녹인 후 0.45㎛ 필터로 여과한 여액을 하기 표 1의 HPLC 분석 조건에서 성분을 분석하였다. 성분을 분석한 결과 흑삼 1g당 Rb1이 2.3mg, Rb2가 2.1mg, Rc가 1.3mg, Rd가 1.4mg, Re가 0.5mg, Rg1이 1.2mg, Rk1이 3.7mg, Rg5가 4.7mg, Rg3(S)이 5.4mg, Rg3(R)이 4.5mg이 존재함을 확인하였다. 즉, 기존의 구증구폭의 원리를 이용하여 제조한 흑삼과 비교했을 때 우수하거나 유사한 수준으로 인삼 사포닌이 존재한 다는 것을 확인할 수 있었다.

표 1

<48>

컬럼: Shiseido C18 column (5㎛, 1504.6mm)	
유량(Flow rate)	1mℓ/min
디텍터(Detector)	ELSD-LT detector
용매(Solvent)	A; CH_3CN:H_2O:5%CH_3COOH = 15:80:5, B; CH_3CN:H_2O = 80:20 0분(0%B), 0-10분(30% B), 10-25분(50% B), 25-40(100% B), 40-50분(100% B), 50-55분(0% B), 55-58분(0% B)
온도	40도

<49> **실험예 1. 항암 활성의 측정**

<50> 1-1. 세포내 세포독성 측정

<51> MTT 법 (Rubinstein, L.V. et al., Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 30, p.2418, 1989)으로 세포독성을 측정하였다. 세포독성 측정 시 사용한 세포주로는 MCF-1(human breast carcinoma cells line), HT-1080(Human human, Caucasian, fibrosarcoma cell line) 및 Hepa 1C1C7(Murine Hepatoma cell line)을 10% FBS가 첨가된 RPMI1640으로 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 세포를 배양한 후 트립신-EDTA를 이용하여 세포를 배양용기로부터 분리하고 1×10^4의 세포를 96웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 비교실시예 1 및 실시예 2에서 수득한 시료를 농도별로 계대 희석하여 웰당 100㎕씩 분주하였다. 이를 48시간 배양한 후 MTT(5mg/mℓ)를 10㎕씩 넣고 4시간동안 배양한 후 PBS(phosphate-buffered solution)로 세척하였다. 이 세척한 플레이트를 DMSO 100㎕를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 ELISA 570nm에서 흡광도를 측정하였고 시료를 처리하지 않은 대조군을 100%로 하여 사멸률을 계산하여 결과를 표 2에 나타내었다. 실험 결과, 흑삼 추출물은 홍삼 추출물에 비해서 실험에 사용된 3 종류의 암세포에 대해서 강한 세포독성을 나타내었다.

표 2

<52>

시료	IC_{50} (㎍/mℓ)		
	MCF-7	HT-1080	Hepa 1C1C7
흑삼	304.3±24.56	293.8±35.42	327.3±48.07
홍삼	1,212.3±98.45	1,715.4±67.43	1,034.87±65.09
아드리아마이신(Adriamycin)	0.1±0.05	0.1±0.04	0.3±0.05

<53> 1-2. 마우스에서의 항암효과 측정

<54> 각 실험군은 동일하게 BDF-1 마우스 5 마리를 한 군으로 하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 마우스는 4 주령의 체중이 20~23g 의 건강한 수컷 BDF-1 으로서 '중앙실험동물센터' 에서 공급받아 24℃ 로 온도조절이 된 곳에서 물과 먹이를 제한 없이 공급하며 사육하고 사료는 항생제 무첨가 마우스용 사료를 사용하였다. 테루히로(Teruhiro)의 방법(Kim Y. et al., Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from Pulsatilla koreana, *Planta Med.*, 68(3), pp.271-274, 2003)으로 마우스의 왼쪽 겨드랑이부위에 RPMI 1640을 포함한 10% FBS 배지에 계대배양중인 세포(Lewis lung carcinoma cell, 1×10^6 cell/mouse)를 이식하였다. 시료는 암 이식 24시간 후부터 체중변화를 점검하면서 2주간 복강 주사하였다. 대조군의 암세포 부피(tumor volume)가 약 2cm^3 정도 되었을 때부터 암세포의(tumor) 크기를 측정한 다음 하기 수학식 1로 암세포

의 부피를 구하고 각 시료의 항암효과를 수학식 2로 계산하였다.

수학식 1

<55> T.V. (tumor volume, mm^3) = L(mm) X $S^2(mm^2)/2$

수학식 2

<56> 항암효과(%) = Mean T.V. of control group-Mean T.V. of treated group/ Mean T.V. of control group X 100

<57> L: Long length

<58> S: Short length

<59> T.V.: Tumor Volume, mm^3

<60> I.R.T.V.: Inhibition Ratio of Tumor Volume

<61> 실험 결과 표 3에서 보여지는바와 같이 대조군으로 사용된 일반적으로 임상에 사용되는 항암제인 탁솔(taxol)의 항암효과는 38.9%로 나타났고, 본 발명의 흑삼 추출물은 35.4%, 비교 실시예 1에서 제조된 홍삼 추출물은 23.3%의 항암효과를 나타내어, 본 발명의 흑삼 추출물은 탁솔과 유사하고, 홍삼 추출물에 비하여 강한 항암효과를 나타냄을 확인하였다.

표 3

<62>

시료	투여량(mg/kg/day)	항암 활성 (%)
흑삼	20	35.4
홍삼	20	23.3
탁솔	12.5	38.9

<63>

<64> **실험예 2. 급성독성실험**

<65> 6 주령의 특정병원체부재(specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 각 그룹 당 2마리씩의 동물에 본 발명의 흑삼 추출물을 1g/kg의 용량으로 1회 경구투여 하였다. 실험 물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 강장기와 흉강 장기의 이상여부를 관찰하였다.

<66> 그 결과, 실험 물질을 투여한 모든 동물에서 특이할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 본 발명의 추출물은 랫트에서 각각 1g/kg까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량(LD_{50})은 1g/kg이상인 안전한 물질로 판단되었다.

<67>

<68> 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<69> **제제예 1. 산제의 제조**

<70> 실시예 1의 흑삼 20 mg

<71> 유당 100 mg

<72> 탈크 10 mg

<73> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

<74> **제제예 2. 정제의 제조**

<75> 실시예 1의 흑삼 10 mg

<76> 옥수수전분 100 mg

<77> 유당 100 mg

<78> 스테아린산 마그네슘 2 mg

<79> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<80> **제제예 3. 캅셀제의 제조**

<81> 실시예 1의 흑삼 추출물 10 mg

<82> 결정성 셀룰로오스 3 mg

<83> 락토오스 14.8 mg

<84> 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

<85> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<86> **제제예 4. 주사제의 제조**

<87> 실시예 1의 흑삼 추출물 10 mg

<88> 만니톨 180 mg

<89> 주사용 멸균 증류수 2974 mg

<90> $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 26 mg

<91> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ㎖) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<92> **제제예 5. 액제의 제조**

<93> 실시예 1의 흑삼 추출물 20 mg

<94> 이성화당 10 g

<95> 만니톨 5 g

<96> 정제수 적량

<97> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100㎖로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<98> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<99> 실시예 2의 흑삼 추출물 1000 mg

<100> 비타민 혼합물 적량

<101> 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

<102> 비타민 E 1.0 mg

<103> 비타민 B_1 0.13 mg

<104> 비타민 B_2 0.15 mg

<105> 비타민 B_6 0.5 mg

<106> 비타민 B_{12} 0.2 ㎍

<107> 비타민 C 10 ㎎

<108> 비오틴 10 ㎍

<109> 니코틴산아미드 1.7 ㎎

<110> 엽산 50 ㎍

<111> 판토텐산 칼슘 0.5 ㎎

<112> 무기질 혼합물 적량

<113> 황산제1철 1.75 ㎎

<114> 산화아연 0.82 ㎎

<115> 탄산마그네슘 25.3 ㎎

<116> 제1인산칼륨 15 ㎎

<117> 제2인산칼슘 55 ㎎

<118> 구연산칼륨 90 ㎎

<119> 탄산칼슘 100 ㎎

<120> 염화마그네슘 24.8 ㎎

<121> 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.

<122> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<123> 실시예 1의 흑삼 추출물 100 ㎎

<124> 비타민 C 15 g

<125> 비타민 E(분말) 100 g

<126> 젖산철 19.75 g

<127> 산화아연 3.5 g

<128> 니코틴산아미드 3.5 g

<129> 비타민 A 0.2 g

<130> 비타민 B_1 0.25 g

<131> 비타민 B_2 0.3g

<132> 물 정량

<133> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

<134> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

발명의 효과

<135> 상기와 같이, 본 발명은 기존 구증구폭의 방법으로 제조된 흑삼에 비하여 시간이 단축되고, 대량 생산이 가능하면서도 기존의 방법으로 제조된 흑삼보다 우수한 또는 유사한 수준으로 인삼 사포닌이 존재하는, 항암효과가 뛰어난 흑삼 및 이의 제조방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

<l> 도 1은 흑삼 증숙시 사용한 옹기를 나타낸 도이다.

도면

도면1

