



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월21일
 (11) 등록번호 10-1688002
 (24) 등록일자 2016년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/258 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0132397
 (22) 출원일자 2014년10월01일
 심사청구일자 2014년10월01일
 (65) 공개번호 10-2016-0039733
 (43) 공개일자 2016년04월12일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020110078525 A*
 KR1020130074118 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
중앙대학교 산학협력단
 서울 동작구 흑석동 221
고성권
 세종특별자치시 나리1로 15, 309동 1204호(한솔동, 첫마을아파트)
 (72) 발명자
손의동
 서울특별시 동작구 현충로 119 102동 1102호 (흑석동, 명수대현대아파트)
고성권
 서울특별시 성동구 독서당로62길 43 7동 1001호 (응봉동, 대림1차아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 4 항

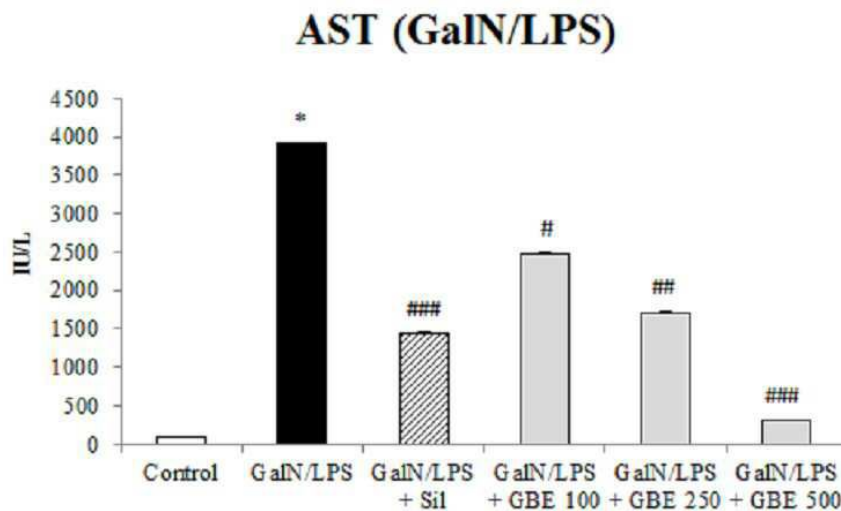
심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 **초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 초음파 처리를 통하여 인삼의 주요 약리성분인 진세노사이드(ginsenoside) Rg2, Rh1 및 F4 함량이 증가된 인삼열매 추출물이 간질환 치료제로 사용되고 있는 실리마린과 유사하거나, 탁월한 간 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 간부전 및 비 알콜성 지방간(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; NAFLD) 또는 알콜성 지방간(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; NAFLD)과 같은 간질환 예방 또는 치료를 위한 약학조성물 또는 건강식품조성물로 제공될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

남윤진

서울특별시 동작구 상도로53길 51 201호 (상도1동)

김성태

서울특별시 강동구 양재대로 1340 420동 503호 (둔
촌동, 주공아파트)

배진형

서울특별시 강남구 언주로 107 210동 408호 (개포
동, 현대2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 113021031HD030

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 고연

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 초음파 처리 인삼열매 조성물의 간기능 개선 생리활성 시험

기 여 율 1/1

주관기관 중앙대학교 산학협력단

연구기간 2013.07.01 ~ 2015.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

80 내지 120℃ 온도에서 8 내지 12 시간 초음파 처리하여, 진세노사이드 (ginsenoside) Rg2, Rg3, Rh1, Rk1 및 F4를 증가시킨 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간부종, 비알콜성 지방간 또는 알콜성 지방간 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 인삼열매 추출물은 C1 내지 C4의 알코올 또는 이의 수용액으로 추출한 것을 특징으로 하는 간부종, 비알콜성 지방간 또는 알콜성 지방간 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 초음파 처리된 인삼열매 추출물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 90 중량부로 함유되는 것을 특징으로 하는 간부종, 비알콜성 지방간 또는 알콜성 지방간 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

80 내지 120℃ 온도에서 8 내지 12 시간 초음파 처리하여, 진세노사이드 (ginsenoside) Rg2, Rg3, Rh1, Rk1 및 F4를 증가시킨 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간부종, 비알콜성 지방간 또는 알콜성 지방간 예방 또는 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강식품조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 간은 영양소 대사의 중심 역할을 하는 장기로 정상적인 사람의 간은 약 1,500g의 무게를 가지며 간 기능이상이 초래되면 생체의 영양소 대사에 문제를 유발하여, 포도당을 글리코겐으로 만들거나 또는 단백질을 알부민으로 전환하거나 불필요한 것을 분해하여 쓸개즙으로 전달하는 등의 간 기능의 이상이 생긴다.

[0003] 일반적으로 간에 염증이 생기는 간염이 간질환의 대부분을 차지하며, 양상에 따라 급성 간염과 만성 간염, 원인에 따라 바이러스성 간염, 알콜성 간염, 약물성 간염 등으로 나눌 수 있다. 또한, 이런 이상으로 유발되는 간질환에는 지방간, 간염, 간경변증, 간암 등이 있다. 간질환의 진행 과정의 기전은 완전히 밝혀지지 않았으나 일

차적으로 지방간이 발생된 후 이차적인 세포 손상이 수반되어 지방간염 및 간경화등의 진행성 간질환으로 발전하는 것으로 생각되며, 따라서 지방간의 발생 자체를 효과적으로 제어할 수 있다면 보다 심각한 간질환의 발생을 예방할 수 있을 것으로 생각된다. 간질환의 치료에는 운동이나 금주, 식이요법 등과 약물 치료를 병행하여 치료하고 있지만, 현재까지 확립된 치료방법이 없으며 근본적으로 완전한 치유가 어렵다.

[0004] 시중에 처방되는 간질환 치료약은 대개 동물 또는 임상 실험에서 급성 간손상에 대한 예방 및 치료 효과를 보이는 것들로 실리마린(레갈론), UDCA(우르사), PMC(니셀)등이 그러한 약들이나 아직까지 확실한 치료효과를 보이는 약은 없는 실정이다.

[0005] 인삼열매는 예로부터 인삼보다 귀하게 여겨지는 것으로 종자획득을 목적으로 선별되어 수확되어 왔다. 이러한 인삼열매는 인삼의 재배기간 중 4년생에 한해 1회만 채종하게 되며, 채종회수를 재배기간 중 2회 이상 채종하면 수량 및 인삼의 품질이 크게 저하되기 때문에 생산량도 많지 않다. 인삼의 대표적인 생리활성 성분인 진세노사이드(ginsenoside)는 인삼의 지상 및 지하부에 고르게 분포되어 있으나, 인삼열매의 진세노사이드는 인삼근과는 다른 진세노사이드 성분 함량 및 조성을 가지는 것으로 보고되어 있다.

[0006] 한편, 한국공개특허 제10-2009-0002647호는 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 중금속 중독완화용 조성물에 관한 것으로, 납과 카드뮴과 같은 중금속 중독에 의한 간 손상 및 신장 손상을 완화시키기 위한 방법으로 인삼열매 추출물이 함유된 조성물을 사용하는 방법을 개시하고 있으나, 본 발명의 초음파 처리된 인삼열매 추출물에 대한 언급이 없으며, 중금속 중독에 의한 간손상 이외의 간 부종, 비 알콜성 지방간 또는 알콜성 지방간에 대한 효과는 개시하고 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 초음파 처리를 통하여 인삼의 주요 약리성분인 진세노사이드(ginsenoside)Rg2, Rg3, Rh1, Rk1 및 F4 함량이 증가된 인삼열매 추출물이 간 손상을 완화시키고 예방하는 효과를 발견함에 따라, 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 개선용 건강식품조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, 급성 간부전 동물모델인 GalN/LPS로 유도된 급성 간 독성 모델 및 에탄올에 장기 노출된 알콜성 지방간 동물모델에 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 투여하고 간 손상 지표인 ALT 및 AST 와 산화적 손상 지표인 SOD 및 GPx 활성도를 확인한 결과, 초음파 처리를 통하여 인삼의 주요 약리성분인 진세노사이드(ginsenoside) Rg2, Rg3, Rh1, Rk1 및 F4 함량이 증가된 인삼열매 추출물이 간질환 치료제로 사용되고 있는 실리마린과 유사하거나, 탁월한 간 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 간부전 및 비 알콜성 지방간(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; NAFLD) 또는 알콜성 지방간(Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; NAFLD)과 같은 간질환 예방 또는 치료를 위한 약학조성물 또는 건강식품조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 GalN/LPS로 유도된 급성 간 독성 동물모델에서 실리마린 150 mg/kg 또는 초음파 처리된 인삼열매 추출물 (GBE) 100, 250 및 500 mg/kg을 3주간 투여한 후 각각의 실험군 동물의 혈청에서 AST(aspartate aminotransferase)수준을 확인한 그래프이다(*; p<0.01 vs Control, #; p<0.05 vs GalN/LPS, ##; p<0.01 vs GalN/LPS, ###; p<0.001 vs GalN.LPS).

도 2는 GalN/LPS로 유도된 급성 간 독성 동물모델에서 실리마린 150 mg/kg 또는 초음파 처리된 인삼열매 추출물 (GBE) 100, 250 및 500 mg/kg을 3주간 투여한 후 각각의 실험군 동물의 혈청에서 ALT(alanine

aminotransferase)수준을 확인한 그래프이다(*; p<0.01 vs Control, #; p<0.05 vs GalN/LPS, ##; p<0.01 vs GalN/LPS).

도 3은 GalN/LPS로 유도된 급성 간 독성 동물모델에서 실리마린 150 mg/kg 또는 초음파 처리된 인삼열매 추출물 (GBE) 100, 250 및 500 mg/kg을 3주간 투여한 후 각각의 실험군 동물의 간 조직에서 SOD 활성을 확인한 결과이다(*; p<0.001 vs Control, #; p<0.001 vs GalN/LPS).

도 4는 GalN/LPS로 유도된 급성 간 독성 동물모델에서 실리마린 150 mg/kg 또는 초음파 처리된 인삼열매 추출물 (GBE) 100, 250 및 500 mg/kg을 3주간 투여한 후 각각의 실험군 동물의 간 조직에서 GPx 활성을 확인한 결과이다(*; p<0.001 vs Control, #; p<0.001 vs GalN/LPS).

도 5는 GalN/LPS로 유도된 급성 간 독성 동물모델에서 실리마린 150 mg/kg 또는 초음파 처리된 인삼열매 추출물 (GBE) 100, 250 및 500 mg/kg을 3주간 투여한 후 각각의 실험군 동물의 간 조직에 헤마톡실린-에오신 염색 후 간 손상 정도를 확인한 결과로, A는 대조군이며, B는 GalN/LPS 음성대조군이며, C는 실리마린 150 mg/kg 투여군이며, D는 GBE 100 mg/kg 투여군이며, E는 GBE 250 mg/kg 투여군이며, F는 GBE 500 mg/kg 투여군이다.

도 6은 에탄올(EtOH)에 장기노출된 간 독성 동물모델에서 실리마린 150 mg/kg 또는 초음파 처리된 인삼열매 추출물(GBE) 100, 250 및 500 mg/kg을 3주간 투여한 후 각각의 실험군 동물의 혈청에서 AST(aspartate aminotransferase)수준을 확인한 그래프이다(*; p<0.05 vs Control, #; p<0.05 vs EtOH).

도 7은 에탄올(EtOH)에 장기노출된 간 독성 동물모델에서 실리마린 150 mg/kg 또는 초음파 처리된 인삼열매 추출물(GBE) 100, 250 및 500 mg/kg을 3주간 투여한 후 각각의 실험군 동물의 혈청에서 ALT(alanine aminotransferase)수준을 확인한 그래프이다(*; p<0.05 vs Control, #; p<0.05 vs EtOH).

도 8은 에탄올(EtOH)에 장기노출된 간 독성 동물모델에서 실리마린 150 mg/kg 또는 초음파 처리된 인삼열매 추출물(GBE) 100, 250 및 500 mg/kg을 3주간 투여한 후 각각의 실험군 동물의 간 조직에서 SOD 활성을 확인한 결과이다(*; p<0.01 vs Control, #; p<0.01 vs EtOH).

도 9는 에탄올(EtOH)에 장기노출된 간 독성 동물모델에서 실리마린 150 mg/kg 또는 초음파 처리된 인삼열매 추출물(GBE) 100, 250 및 500 mg/kg을 3주간 투여한 후 각각의 실험군 동물의 간 조직에서 GPx 활성을 확인한 결과이다(*; p<0.01 vs Control, #; p<0.01 vs EtOH).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 인삼열매 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올, 핵산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 이루어진 균으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것일 수 있으며, 상세하게는 상기 인삼열매 추출물은 인삼열매를 C1 내지 C4의 알코올로 추출한 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올로 추출한 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 인삼열매 추출물은 발진기 600W, 진동부 600 W의 초음파 발생장치를 이용하여 80 내지 120 ℃ 온도 범위에서 8 내지 12 시간 초음파 처리될 수 있으며, 상세하게는 90 내지 110 ℃ 온도 범위에서 9 내지 11 시간 초음파 처리될 수 있으며, 보다 바람직하게는 100 ℃ 온도에서 10 시간 초음파 처리될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0015] 상기 온도 및 시간 범위로 초음파 처리될 경우, 홍삼 제조시 열에 의해 소량 생산되는 주요 약리성분인 진세노사이드(ginsenoside) Rg2, Rg3, Rh1, Rk1 및 F4 함량이 증가된 인삼열매 추출물을 얻을 수 있다.
- [0016] 따라서, 상기 초음파 처리된 인삼열매 추출물은 진세노사이드(ginsenoside)Rg2, Rg3, Rh1, Rk1 및 F4 함량이 증가된 간질환 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 간질환은 간부종, 비 알콜성 지방간 및 알콜성 지방간으로 이루어진 균에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 따르면, 급성 간부종 동물모델 및 알콜성 지방간 동물모델에 본 발명의 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 3주간 투여한 결과, 도 1 및 도 2와 같이 급성 간부종 동물모델에서 간 손상 정도를 나타내는 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)의 높은 수준이 간질환 치료제인 실리마린

보다 탁월한 감소 효과를 나타내었으며, 도 3 및 도 4와 같이 간의 산화적 손상 정도를 나타내는 SOD(Superoxide dismutase) 및 글루타치온 산화효소(Glutathione Peroxidase; GPx)의 활성도 역시 감소시켰다. 또한 에탄올 장기 투여에 의한 알콜성 지방간 동물모델에서도 도 1 내지 도 4와 같이 급성 간부종 동물모델과 유사한 간 보호 또는 치료 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 본 발명의 초음파 처리된 인삼열매 추출물은 간질환 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있음이 확인되었다.

- [0019] 따라서, 본 발명의 초음파 처리된 인삼열매 추출물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 90 중량부로 함유될 수 있다.
- [0020] 상기 약학조성물은 상기 초음파 처리된 인삼열매 추출물 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 약품 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 약학적 조성물은 첨가제로서 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 약학조성물은 간 질환 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 본 발명의 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, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물 중 유효성분의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중 등에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0022] 상기 약학조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜제조될 수 있다. 이때, 제형은 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엘렉시르제, 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 경고제, 로션제, 연고제 등의 형태일 수 있다.
- [0023] 또한 본 발명은 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 개선용 건강식품조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품은 유효성분인 본 발명에 따른 우르솔산 및 루신 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0025] 상기 건강식품에 함유된 초음파 처리된 인삼열매 추출물의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0026] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0027] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0028] <실시예 1> 초음파 처리 인삼열매 추출물 제조
- [0029] 1. 제조과정
- [0030] 인삼열매 건조물 500 g에 에틸알콜 2,500 ml를 가하고, 4회 환류 추출하고 여과한 후 감압농축하여 에틸알콜 인삼열매 엑기스를 얻었다.
- [0031] 상기 에틸알콜 인삼열매 엑기스 1 g에 증류수 200 ml를 가하고, 발진기 600 W, 진동부 600 W 규격의 초음파분산기(Sonicator)에 넣은 후 100 °C 조건에서 10 시간 초음파 처리하였다.

- [0032] 그 후 초음파 처리된 인삼열매 추출물을 감압농축시킨 후 동결 건조시켜 갈색 추출물을 얻었다.
- [0033] 또한 비교예를 위해, 초음파 처리되지 않은 인삼열매 건조물 500 g에 에틸알콜 2,500 ml를 가하고, 2회 환류 추출하고 여과한 후 감압농축하여 에틸알콜 인삼열매 엑기스를 얻었다.
- [0034] 상기 얻어진 인삼열매 엑기스를 동결 건조시켜 갈색의 추출물을 얻었다.
- [0035] 2. HPLC법을 통한 진세노사이드 성분 분석
- [0036] 상기 제조된 각각의 인삼열매 추출물 2 g에 디에틸에테르(diethyl ether) 50 ml를 가하고, 1시간씩 3회 진탕 추출한 후, 원심분리하여 상등액을 제거하였다.
- [0037] 그 후, 얻어진 잔사에 수포화 부탄올(butanol) 50 ml를 가하고, 2시간씩 3회 추출하고, 원심분리하여 상등액을 취한 후 여과하였으며, 이를 감압농축하여 조사포닌을 얻었다. 이렇게 얻어진 조사포닌을 HPLC법에 의해 정량화 하였다.
- [0038] 사용한 HPLC 장치는 Waters 1525 binary HPLC system (Waters, 미국)이며, 컬럼은 Eurospher 100-5 C18(250*3 mm)을 사용하였다. 이동상은 아세토나이트릴(acetonitrile; HPLC급, Sigma, 미국)과 HPLC용 증류수이며, 아세토나이트릴(acetonitrile)의 비율을 17 %(0 분)에서 25 %(25 분), 40 %(50 분), 60 %(105 분) 그리고 100 %(110 분)로 순차적으로 늘려주고 마지막으로 다시 17 %로 조절하였다. 전개온도는 실온, 유속은 분당 0.8 ml, 크로마토그램은 uv/vis Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector (Waters, U.S.A.) 검출기를 이용하여 203 nm에서 검출하였다.
- [0039] 그 결과, 표 1과 같이 분석된 진세노사이드는 Rb1, Rb2, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2, Rg3, Rg6, Rh1, Rh4, Rk1, Rk3, F1 및 F4 이었으며, 그 중 홍삼 제조시 열에 의해 소량 생산되는 주요 약리성분인 진세노사이드(ginsenoside) Rg2, Rh1 및 F4 함량이 매우 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 초음파 처리되지 않은 인삼열매 추출물에서는 포함되지 않았던 Rg3 및 Rk1이 높은 함량으로 추출된 것을 확인할 수 있었다.

표 1

진세노사이드	인삼열매 추출물(비교예)	초음파 처리된 인삼열매 추출물
Rb1	0.758±0.179	0.072±0.052
Rb2	0.594±0.114	0
Rd	1.534±0.182	0.025±0.007
Re	11.169±0.158	0.288±0.037
Rf	0.330±0.115	0
Rg1	0.567±0.013	0.033±0.004
Rg2	0.801±0.215	2.278±0.368
20S-Rg3	0	0.432±0.063
20S-Rg3	0	0.400±0.059
Rg6	0.044±0.026	0.445±0.063
Rh1	0.629±0.095	1.350±0.208
Rh4	0	0.083±0.011
Rk1	0	0.2071±0.030
Rk3	0	0.039±0.005
F1	0.193±0.149	0.035±0.017
F4	0.191±0.026	1.210±0.137

[0041] <실시예 2> 갈락토사민/LPS 투여로 유도된 간독성모델에서 인삼열매 추출물의 간 보호 효과 확인

[0042] 1. 실험동물 및 실험물질투여

[0043] 200-250 g의 수컷 S.D. 랫트 72 마리[(주)샘타코]를 12 마리씩 6개의 군으로 나누고, 1군을 대조군(control)으로, 2군은 300 mg/kg 갈락토사민(Galactosamine, Sigma Aldrich Korea, i.p.; GalN) 또는 30 µg/kg LPS(Sigma Aldrich Korea, i.p.) 단독 투여군으로, 3군을 150 mg/kg 실리마린(Sigma Aldrich Korea, p.o.) 투여군으로, 4, 5 및 6군은 실시예 1과 같이 제조된 초음파 처리 인삼 열매 추출물 100, 250 및 500 mg/kg 투여군으로 나누고 1 및 2군은 3주간 각각 생리식염수를 투여하였으며, 3, 4, 5 및 6 군에는 해당하는 물질들을 상기 용량으로 3주간 투여하였다.

[0044] GalN 300 mg/kg 및 LPS 30 μg/kg(GalN/LPS)를 복강투여 하였다. GalN/LPS 투여 24시간 후 경추탈골법을 통하여 랫트를 희생시키고, 희생된 랫트로부터 혈액 및 간을 수집하였다.

[0045] 실험물질 투여기간 동안 랫트의 이상증상, 체중변화와 사료 및 물 섭취량을 매일 기록하였다.

[0046] 그 결과, 실험기간 중 실험동물들에게서 이상 증상은 발견되지 않았으며, 표 1과 같이 각 군별로 사료 및 물 섭취량과 체중변화 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다.

표 2

Body Weight (GalN/LPS)

	Day 1	Day 21
Control	228.25 ± 1.93	359.25 ± 12.44
GalN/LPS	229.25 ± 6.08	338 ± 11.48
GalN/LPS + Si1	228.75 ± 4.28	337.75 ± 7.16
GalN/LPS + GBE 100	236.86 ± 3.51	340.86 ± 6.57
GalN/LPS + GBE 250	257.63 ± 4.28	349 ± 7.03
GalN/LPS + GBE 500	259.38 ± 4.46	352.5 ± 8.04

[0048] 2. AST 및 ALT 측정을 통한 간 손상 정도 확인

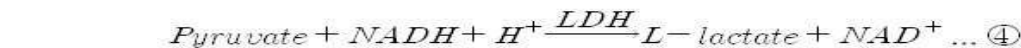
[0049] 실시예 2-1의 실험동물의 각 군별로 수집한 혈액을 4 °C에서 15000 g로 20분간 원심분리하여 분리된 혈청에서 간 손상 정도의 대표적인 지표인 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)를 UV without P-5-P IFCC 법(Beckman Coulter 시약, Ireland)을 수행하여 확인하였다.

[0050] AST의 경우,



[0052] 의 반응식을 응용하여, 340 nm에서 흡광도 차이를 이용하여 확인하였으며,

[0053] ALT의 경우,



[0055] 의 반응식을 응용하여, 역시 340 nm에서 흡광도 차이를 이용하여 확인하였다.

[0056] 그 결과, 도 1 및 2와 같이 GalN 또는 LPS를 각각 단독 투여한 실험군의 경우, 대조군보다 AST 및 ALT 수준의 급격한 증가가 확인된 반면, 실리마린 및 초음파 처리 인삼열매 추출물이 투여된 실험군에서는 AST 및 ALT 수준이 유의성 있는 감소를 확인할 수 있었으며, 초음파 처리 인삼열매 추출물을 투여한 실험군의 경우 농도의존적인 AST 및 ALT 수준 감소가 확인되었다.

[0057] 특히, 초음파 처리 인삼열매 추출물 500 mg/kg 투여군의 경우 실리마린 투여군보다 간 손상 보호 효과가 탁월한 것을 확인할 수 있었다.

[0058] 3. SOD 및 글루타치온 산화효소 측정을 통한 산화적 간 손상 정도 확인

[0059] 실시예 2-1의 실험동물의 각 군별로 수집한 간 조직을 조직용해 버퍼를 사용하여 균질화하고, Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (Biovision, USA) 및 Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision, USA) 각각의 키트를 이용하여 각각 간 조직의 산화적 손상 정도를 나타내는

SOD(Superoxide dismutase) 및 글루타치온 산화효소(Glutathione Peroxidase; GPx)의 활성도를 확인하였다.

[0060] 그 결과, 도 3 및 4와 같이 GalN 또는 LPS를 각각 단독 투여한 실험군에서는 대조군보다 SOD 및 GPx의 유의성 있는 활성도 감소가 확인된 반면, 실리마린 및 초음파 처리 인삼열매 추출물이 투여된 실험군에서는 SOD 및 GPx의 활성도가 유의성 있게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0061] 특히, 초음파 처리 인삼열매 추출물이 투여된 실험군에서 SOD 및 GPx의 활성도가 인삼열매 추출물의 농도의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] 4. 조직병리학적 확인

[0063] 실시예 2-1의 실험동물의 각 군별로 수집한 간 조직을 10% 포르말린 용액에 넣어 고정시킨 후 파라핀 블록을 제작하여 헤마톡실린-에오신(H&E) 조직염색을 보고되어진 방법(Shen, L., Xiong, Y., Wang, D.Q., Howles, P., Basford, J.E., Wang, J., Xiong, Y.Q., Hui, D.Y., Woods, S.C., Liu, M. 2013 Ginsenoside Rb1 reduces fatty liver by activating AMP-activated protein kinase in obese rats, J Lipid Res, 54 1430-1438)으로 수행하여 간 상해 정도를 육안으로 확인하였다.

[0064] 그 결과, 도 5와 같이 대조군은 정상적인 간세포 및 간소엽의 형태를 나타내었으나, GalN 또는 LPS를 각각 단독 투여한 실험군(GalN/LPS)에서는 간 상해 지표인 중심소엽 괴사(centrilobular necrosis) 및 염증 세포 침윤(inflammatory cell infiltration)이 나타났으며, 정상적인 간세포 및 간소엽 형태는 확인되지 않았다.

[0065] 반면, 150 mg/kg 실리마린 투여군 및 500 mg/kg 초음파 처리 인삼열매 추출물 투여군에서는 간 상해 지표가 확인되지 않았다.

[0066] 상기 결과로부터 초음파 처리 인삼열매 추출물의 간 보호 효과가 조직병리학적 검사로 확인되었다.

[0067] <실시예 3> 알코올로 유발된 간독성모델에서 인삼 열매 추출물의 간 보호 효과 확인

[0068] 1. 실험동물 및 실험물질 투여

[0069] 200-250 g의 S.D. 랫트 수컷 72 마리[(주)샘타코]를 12마리씩 6개의 군으로 나누고, 1군을 대조군(control)으로, 2군은 150 mg/kg 에탄올(EtOH) 단독 투여군으로, 3군을 150 mg/kg 실리마린(Sigma Aldrich Korea, p.o.) 투여군으로, 4, 5 및 6군은 실시예 1과 같이 제조된 초음파 처리 인삼 열매 추출물을 각각 100, 250 및 500 mg/kg 투여군으로 나눈 후, 3주 동안 3, 4, 5 및 6군의 랫트에 각각의 군에 해당하는 실험물질들 상기 용량으로 투여하였다.

[0070] 각각의 실험물질을 투여하고 1시간 후 2, 3, 4, 5 및 6군의 모든 랫트에 에탄올(EtOH) 5 g/kg을 투여하였으며, 대조군인 1군에 동일한 양의 생리식염수를 투여하였다. 마지막 에탄올(EtOH) 투여 24시간 후 경추탈골법을 통하여 랫트를 희생시키고, 희생된 랫트로부터 혈액 및 간을 수집하였다.

[0071] 실험물질 투여기간 동안 랫트의 이상증상, 체중변화와 사료 및 물 섭취량을 매일 기록하였다.

[0072] 그 결과, 실험기간 중 실험동물들에게서 이상 증상은 발견되지 않았다. 다만, 표 2와 같이 실험 종료 후, 에탄올(EtOH) 단독 투여군에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 체중감소가 확인되었다.

표 3

Body Weight (EtOH)

	Day 1	Day 21
Control	226.5 ± 3.9	375.67 ± 15.31
EtOH	239.13 ± 3.67	353.3 ± 3.25*
EtOH + Sil	236.38 ± 4.28	357.29 ± 4.33
EtOH + GBE 100	239.25 ± 8.9	355.07 ± 9.31
EtOH + GBE 250	229.88 ± 3.65	363 ± 5.93
EtOH + GBE 500	243.25 ± 6.17	366.14 ± 3.62

[0074] 2. AST 및 ALT 측정을 통한 간 손상 정도 확인

[0075] 실시예 3-1 실험동물의 각 군별로 수집한 혈액을 4 °C에서 15000 g로 20 분간 원심분리하여 분리된 혈청에서 간

손상 정도의 대표적인 지표인 AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)를 확인하였다.

[0076] 그 결과, 도 6 및 7과 같이 에탄올(EtOH) 단독 투여군의 경우 대조군보다 AST 및 ALT 수준이 유의성있게 증가된 반면, 실리마린 및 500 mg/kg 초음파 처리 인삼열매 추출물이 투여된 실험군에서는 AST 및 ALT 수준이 유의성 있게 감소하였다.

[0077] 3. SOD 및 글루타치온 산화효소 측정을 통한 산화적 간 손상 정도 확인

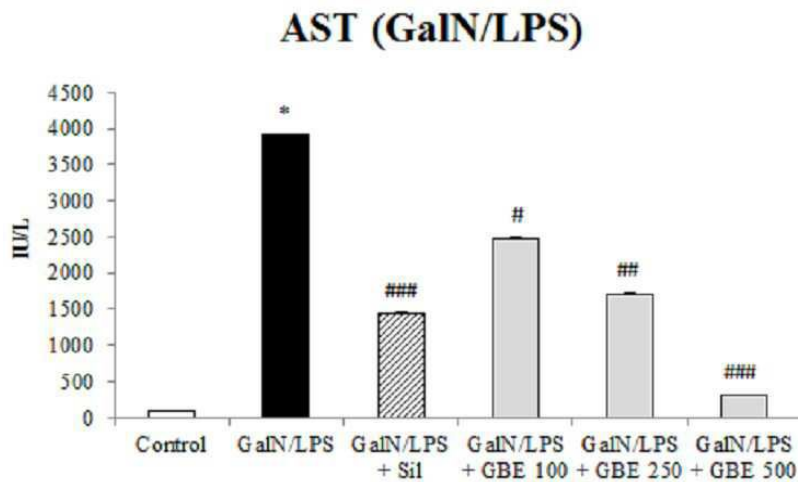
[0078] 실시예 3-1 실험동물의 각 군별로 수집한 간 조직을 조직용해 버퍼를 사용하여 균질화하고 Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (Biovision, USA) 및 Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit (Biovision, USA) 각각의 키트를 이용하여 간 조직의 산화적 손상 정도를 나타내는 SOD(Superoxide dismutase) 및 글루타치온 산화효소(Glutathione Peroxidase; GPx)의 활성도를 확인하였다.

[0079] 그 결과, 도 8 및 9와 같이 에탄올(EtOH) 단독 투여군의 경우 대조군보다 SOD 및 GPx의 활성도가 유의성 있게 감소한 반면, 실리마린 및 초음파 처리 인삼열매 추출물이 투여된 실험군에서는 SOD 및 GPx의 활성도가 유의성 있게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 100 mg/kg 초음파 처리 인삼열매 추출물이 투여된 실험군의 경우 SOD 및 GPx의 활성화 효과가 나타나지 않았으나, 250 및 500 mg/kg이 처리된 실험군에서는 SOD 및 GPx의 활성도가 인삼 열매 추출물의 농도의존적으로 증가하여 산화적인 손상을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

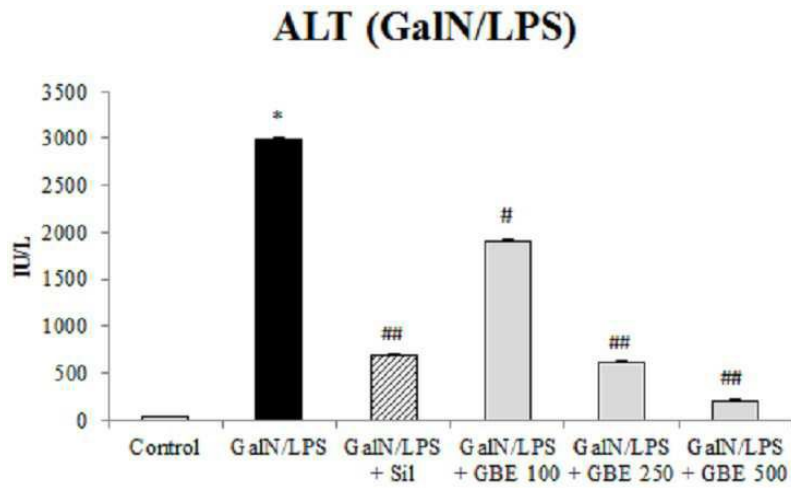
[0080] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업 계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

도면

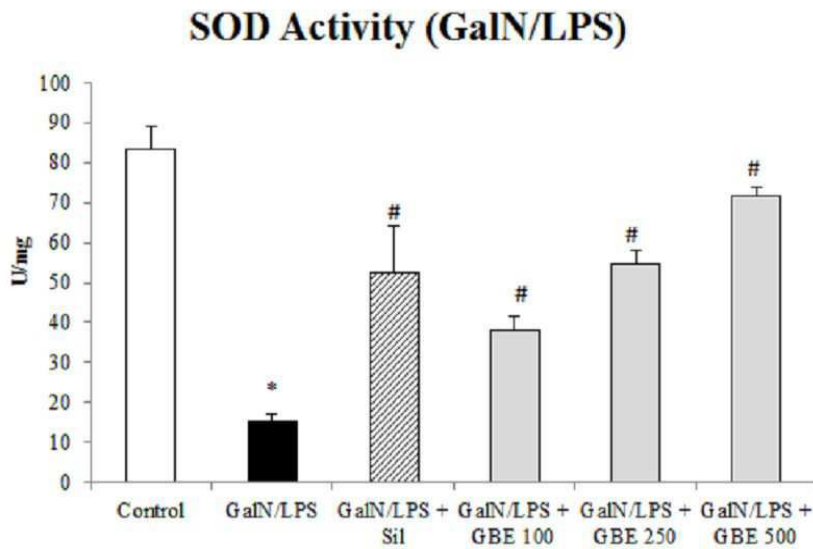
도면1



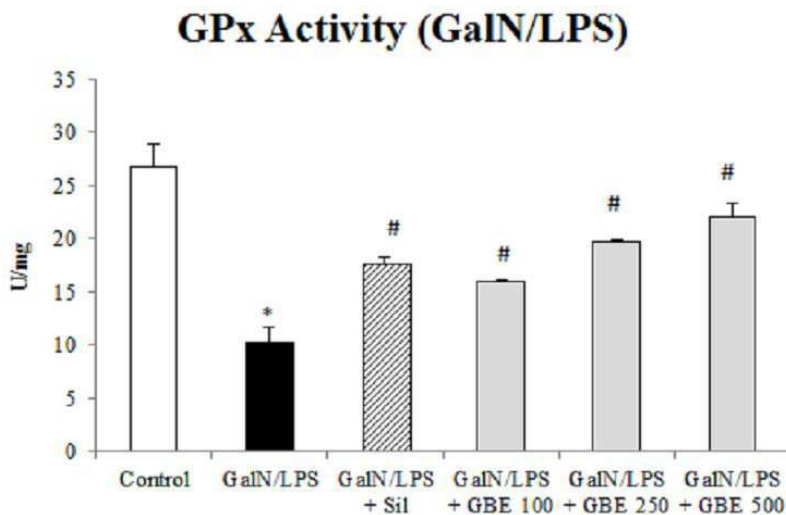
도면2



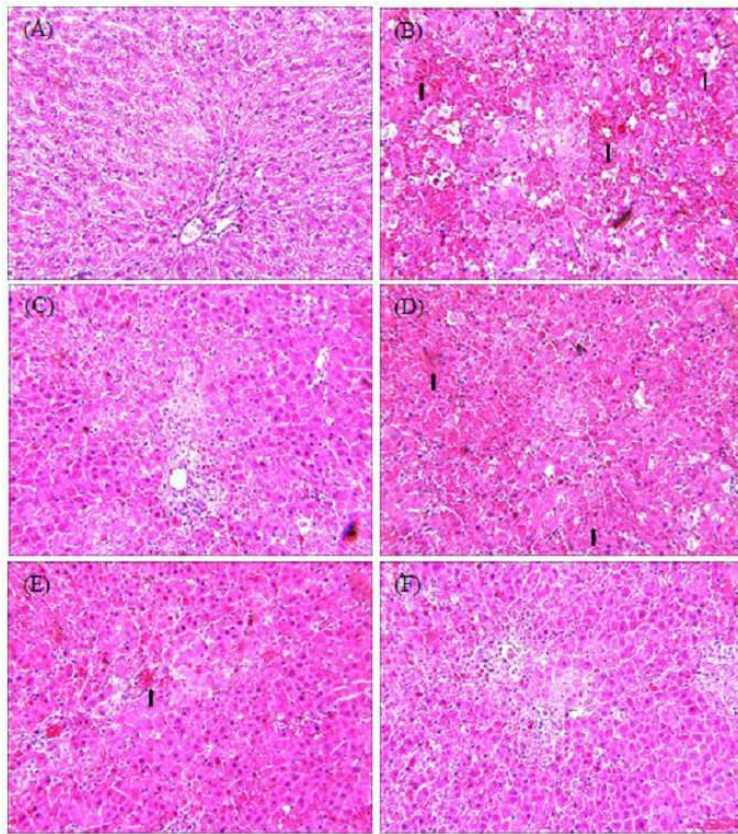
도면3



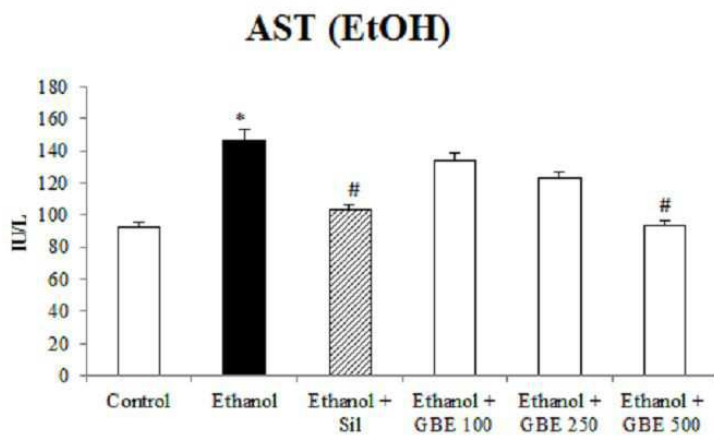
도면4



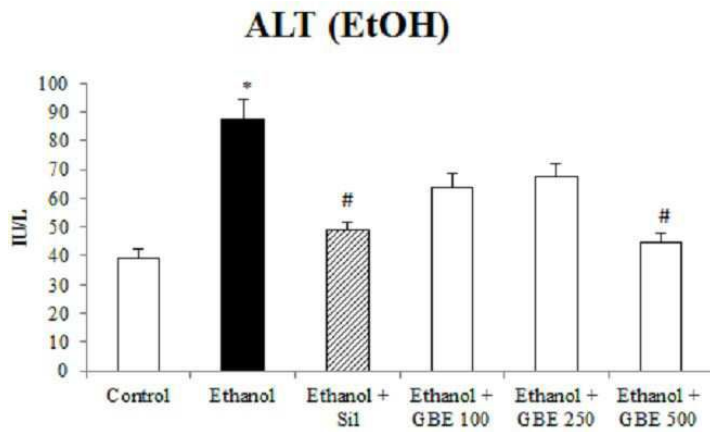
도면5



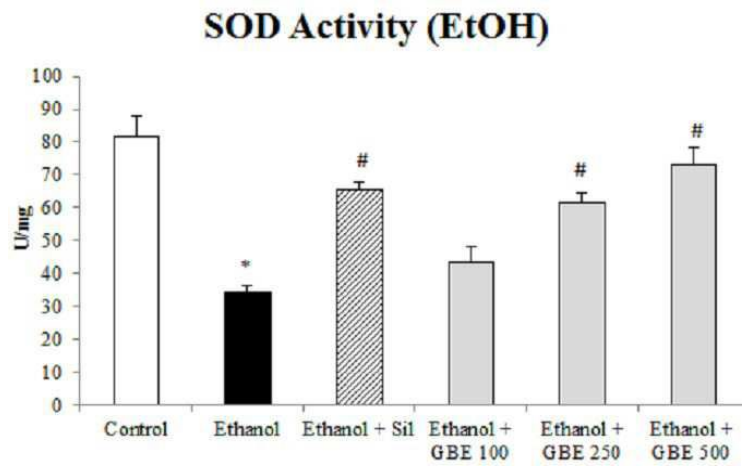
도면6



도면7



도면8



도면9

