(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0045116
(43) 공개일자 2020년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0125732
(22) 출원일자 2018년10월22일
심사청구일자 2018년10월22일

(71) 출원인
(주)비엔텍
광주광역시 북구 제봉로 257 ,2~3층(북동(주)비엔텍)
(72) 발명자
김선오
광주광역시 북구 양일로 52, 201동 1003호
김진석
광주광역시 북구 문산로 61, 106동 602호
(74) 대리인
특허법인유아이피

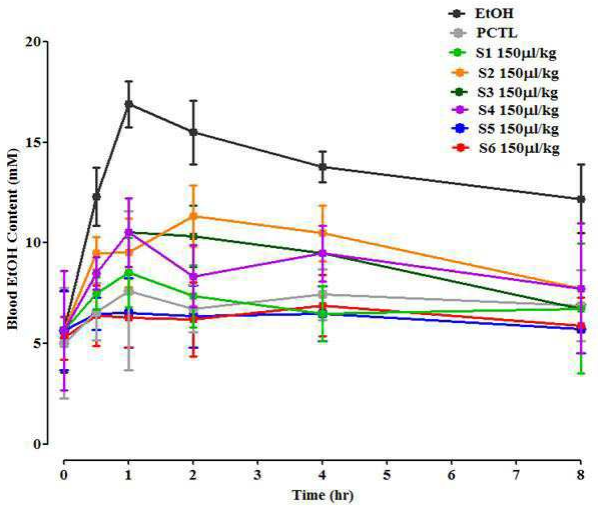
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **복합 천연 추출물을 함유하는 간기능 보호 및 숙취해소용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 복합 천연 추출물을 유효성분으로 함유하는 간기능 보호 및 숙취해소용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 불미나리, 콩나물, 인진쑥, 헛개나무 열매, 모과, 갈근, 감초, 감국 및 미숙과 복분자를 특정 배합비로 함유하는 복합 천연 추출물을 유효성분으로 함유함으로써 우수한 숙취해소 작용 및 간 보호 효과를 나타내는 간기능 보호 및 숙취해소용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A23V 2200/334 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

불미나리, 콩나물, 인진쑥, 헛개나무 열매, 모과, 갈근, 감초, 감국 및 미숙과 복분자의 복합 추출물을 함유하는, 숙취해소용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

대추, 청피, 진피, 갯기름나물 및 방풍으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 추출물을 더 포함하는, 숙취해소용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 불미나리 10 내지 20wt, 콩나물 15 내지 25wt%, 인진쑥 5 내지 10wt%, 헛개나무 열매 5 내지 15wt%, 모과 1 내지 10wt%, 갈근 1 내지 10wt%, 감초 1 내지 10wt%, 감국 1 내지 10wt% 및 미숙과 복분자 5 내지 15wt%로 함유하는, 숙취해소용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 대추 1 내지 10wt%, 청피 10 내지 15wt%, 진피 10 내지 15wt%, 갯기름나물 1 내지 10wt% 또는 방풍 1 내지 10wt%을 더 포함하는, 숙취해소용 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 숙취해소용 식품.

청구항 6

불미나리, 콩나물, 인진쑥, 헛개나무 열매, 모과, 갈근, 감초, 감국 및 미숙과 복분자의 복합 추출물을 함유하는, 알코올 섭취에 대한 간기능 보호용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

대추, 청피, 진피, 갯기름나물 및 방풍으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 추출물을 더 포함하는, 알코올 섭취에 대한 간기능 보호용 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 불미나리 10 내지 20wt, 콩나물 15 내지 25wt%, 인진쑥 5 내지 10wt%, 헛개나무 열매 5 내지 15wt%, 모과 1 내지 10wt%, 갈근 1 내지 10wt%, 감초 1 내지 10wt%, 감국 1 내지 10wt% 및 미숙과 복분자 5 내지 15wt%로 함유하는, 알코올 섭취에 대한 간기능 보호용 조성물.

청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 대추 1 내지 10wt%, 청피 10 내지 15wt%, 진피 10 내지 15wt%, 갯기름나물 1 내지 10wt% 또는 방풍 1 내지 10wt%을 더 포함하는, 알코올 섭취에 대한 간기능 보호용 조성물.

청구항 10

제 6항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 알코올 섭취에 대한 간기능 보호용 기능성 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 복합 천연 추출물을 유효성분으로 함유하는 간기능 보호 및 숙취해소용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 술은 역사적으로 오랫동안 인류사회에서 제조 및 음용되어 왔으며, 현재에 이르러서도 일부 종교문화권을 제외하면 대부분의 인류사회에서 보편적으로 제조 및 음용되고 있다. 특히 우리 나라의 경우에는 사회생활 중 관습적으로 행해지는 음주문화로 술에 대한 노출빈도가 잦으며, 이로 인한 간 손상 및 건강 악화가 사회적으로 문제가 되고 있다. 보건복지부 산하 한국보건사회연구원이 실시한 2001년도 국민건강 영양조사결과에 의하면, 우리나라 20세 이상 성인의 음주율이 69.8%이고, 건강에 문제가 있을 수 있는 중등도음주 초과자 비율은 20세 이상 성인의 30.6%, 음주자의 63.4%에 달하는 것으로 나타났다. 현대인들은 과량의 알코올 섭취로 인하여 갈증, 피로감, 컨디션 저하, 기억력 감퇴, 현기증, 소화 불량, 구토, 설사 등의 숙취로 고생하는 경우가 늘었고, 알코올 중독의 위험성도 증가했다.

[0004] 정상적인 알코올 대사과정은, 알코올류가 섭취되는 경우 위장 또는 소장에서 흡수되어 10%가 호흡, 소변, 땀 등으로 배설되고 90%가 혈관 중으로 들어가 간장에서 대사된다. 먼저 알코올분해효소(Alcohole Dehydrogenase, ADH)에 의하여 아세트알데히드가 되며, 이것이 간세포에 존재하는 알데히드분해효소(Acetaldehyde Dehydrogenase, ALDH)에 의하여 아세트산으로 분해된 후 근육 또는 지방 조직 등으로 옮겨져 탄산가스와 물로 분해된다. 사람들이 숙취를 느끼는 주 원인이 되는 물질로 아세트알데히드가 대표적인 것으로 알려져 있는데, 아세트알데히드는 미주신경, 교감신경내의 구심성신경섬유를 자극하여 구토, 홍조, 어지러움, 박동수 및 호흡횟수의 증가 등의 증상을 나타내게 된다. 최근 연구 보고에서는 아세트알데히드 외에도 메탄올과 같은 독성 알코올에 의하여 백혈구가 자극받아 유도되는 염증반응 및 탈수현상 등이 종합적으로 작용하여 숙취를 일으키는 것으로 알려졌다.

[0005] 알데히드분해효소는 ALDH1 형과 ALDH2 형이 있는데 이 중 동양인은 일반적으로 서양인에 비해 ALDH2 형이 결핍되어 아세트알데히드의 산화가 느린 것으로 알려져 있다. 이에 따라 음주 후 다양한 숙취증상을 느끼는 것이 드물지 않으며, 이러한 음주후의 숙취증상을 저감 또는 방지하기 위하여 보다 인체에 미치는 부작용이 적으면서 효과가 뛰어난 숙취해소 조성물의 개발이 요구되고 있다. 음주로 인한 숙취를 효과적으로 해소하기 위한 조성물로 생약성분의 추출물 등을 포함하는 조성물이 시판되고 있으나, 일부 생약제를 함유하는 조성물이 권태감, 팽만감, 구토감 등을 유발하거나 또는 지나치게 고가의 생약제 성분을 포함하여 지나치게 높은 가격으로 판매되어 접근성이 어려운 점 등의 문제가 있다.

[0006] 불미나리(*Oenanthe Javanica D.C*)는 산형과에 속하는 다년생 초본으로 비타민 A, 비타민C와 칼슘, 철분 등 비타

민, 무기질이 풍부한 대표적인 알칼리성 식품으로서 미나리강회, 미나리무침, 미나리김치, 보리 미나리전, 미나리생채, 미나리튀김, 각 종 매운탕 등 일상에서 많이 사용되고 있다.

[0007] 콩나물(bean sprout)은 대두를 발아시킨 것으로 비타민 B 1 , 비타민 B 2 , 비타민 C가 많이 함유되어 있다.

[0008] 인진쑥(*Artemisia capillaries Thunberg*)은 비타민A의 함량이 많아 암예방에 효과적이고 발암물질의 생성이나 활성을 억제하는데 중요한 역할을 하며, 또한 인진쑥 추출물은 대단히 강한 혈청 지질의 억제작용이 있어 동맥경화 및 고혈압을 예방하는데 좋은 치료제로 쓰여진다.

[0009] 헛개나무(*Hovenia dulcis*)는 갈증 해소에 효능이 있으며, 헛개나무의 활성화학물질이 숙취 해소와 구취 제거 및 변비에 효과를 보이는 것이 알려져 있다.

[0010] 모과는 모과나무(*Chaenomeles sinesis Koehne*)의 열매로서 민간에서는 각기, 붓기, 허리아픔, 뼈마디아픔 등의 처방에 이를 이용하였다.

[0011] 갈근(*Pueraria lobata Ohwi*)은 콩과(*Leguminosae*)로 주피를 제거한 뿌리에 해당되며, 이소플라보노이드(isoflavonoids)로 다이자인(daidzein), 다이진(daidzin), 포모네팀 제니스틴(formonetinm genistein) 등이 함유되어 있다. 진정 작용, 하열 작용 및 혈관의 이완 작용을 하는 것이 알려져 있다.

[0012] 감초(*Glycyrrhiza glabra L.*)는 그 뿌리와 줄기에 글리찌리진, 글라브라산 및 다양한 플라보노이드유사물질이 함유되어 있으며, 단맛이 나며, 진경, 항염증, 항궤양 작용을 하는 것이 알려져 있다.

[0013] 감국(*Chrysanthemum indicum L.*)은 국화과에 속하는 다년생 초본으로, 우리나라 중부 이남의 산간지역에 널리 분포하는 야생국화이다. 예로부터 궁중에서는 국화주로, 민가에서는 고혈압 환자들이 약술로 애용해 왔다.

[0014] 복분자(*Rubus coreanus*)는 폴리페놀을 다량 함유하고 있으며, 항염작용, 항산화작용, 항 헬리코박터 파이로리작용, 항암작용, 노화억제, 동맥경화예방, 혈전예방, 살균 효과 등이 있다는 것이 밝혀졌다.

[0015] 대추(*Zizyphus jujuba Mill var. inermis Rehder*)는 갈매나무과에 속하는 활엽교목으로, 약용과 식용을 겸하여 사용되어 왔다.

[0016] 청피 및 진피는 귤(*Citrus unshiu Markovich*) 또는 그 근연식물(*Rutaceae*)의 과피로, 성숙한 과피를 진피, 미성숙한 녹빛 과피를 청피라 한다. 항알레르기 활성(antiallergic activity)이 있고 진정 효과, 항바이러스 효과를 나타내는 것이 알려져 있다.

[0017] 갯기름나물(*Peucedanum japonicum Thunb.*)은 산형과에 속하는 다년생 식물로서 방풍대용으로 이용하는 약용식물의 하나이고, 항경련, 항알레르기 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다.

[0018] 방풍(*Saposhnikovia divaricata, S. divaricata*)은 쌍떡잎식물 산형화목 미나리과의 세해살이풀로, 중국 북동부, 화베이 및 내몽골이 원산이며 약료 작물로 재배한다. 방풍은 주성분으로 쿠마린(coumarin)계 물질인 임페라토린(imperatorin), 소라렌(psoralen) 및 베르갑텐(bergapten) 등이 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0020] (특허문헌 0001) KR 1020140090453 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명은 불미나리, 콩나물, 인진쑥, 헛개나무 열매, 모과, 갈근, 감초, 감국 및 미숙과 복분자를 특정 조성비로 포함함으로써, 음주로 인한 숙취 증상을 해소 또는 경감시키는 동시에 알코올 섭취에 대한 간기능 보호 효과를 나타낼 수 있는 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명의 일 측면에 따르면, 불미나리, 콩나물, 인진쑥, 헛개나무 열매, 모과, 갈근, 감초, 감국 및 미숙과 복분자의 복합 추출물을 함유하는, 숙취해소용 조성물이 제공될 수 있다.

[0024] 또한, 대추, 청피, 진피, 갯기름나물 및 방풍으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 추출물을 더 포함할 수 있다.

[0025] 또한, 상기 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 불미나리 10 내지 20wt, 콩나물 15 내지 25wt%, 인진쑥 5 내지 10wt%, 헛개나무 열매 5 내지 15wt%, 모과 1 내지 10wt%, 갈근 1 내지 10wt%, 감초 1 내지 10wt%, 감국 1 내지 10wt% 및 미숙과 복분자 5 내지 15wt%로 함유할 수 있다.

[0026] 또한, 상기 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 대추 1 내지 10wt%, 청피 10 내지 15wt%, 진피 10 내지 15wt%, 갯기름나물 1 내지 10wt% 또는 방풍 1 내지 10wt%을 더 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는, 숙취해소용 식품이 제공될 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 불미나리, 콩나물, 인진쑥, 헛개나무 열매, 모과, 갈근, 감초, 감국 및 미숙과 복분자의 복합 추출물을 함유하는, 알코올 섭취에 대한 간기능 보호용 조성물이 제공될 수 있다.

[0029] 또한, 대추, 청피, 진피, 갯기름나물 및 방풍으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 추출물을 더 포함할 수 있다.

[0030] 또한, 상기 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 불미나리 10 내지 20wt, 콩나물 15 내지 25wt%, 인진쑥 5 내지 10wt%, 헛개나무 열매 5 내지 15wt%, 모과 1 내지 10wt%, 갈근 1 내지 10wt%, 감초 1 내지 10wt%, 감국 1 내지 10wt% 및 미숙과 복분자 5 내지 15wt%로 함유할 수 있다.

[0031] 또한, 상기 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 대추 1 내지 10wt%, 청피 10 내지 15wt%, 진피 10 내지 15wt%, 갯기름나물 1 내지 10wt% 또는 방풍 1 내지 10wt%을 더 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는, 알코올 섭취에 대한 간기능 보호용 기능성 식품이 제공될 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명의 일 측면에 따른 복합 천연 추출물을 특정 조성비로 함유하는 조성물은 알코올 분해능이 뛰어나 숙취해소 작용이 우수한 동시에, 알코올에 의한 간세포 손상에 대한 간 보호 효과가 우수하므로, 복용이 용이하고 장기간 보관이 가능하여 음주전·후의 숙취해소 및 간 보호에 유용하게 사용될 수 있는 식품 조성물로 적용될 수 있다.

[0035] 또한, 조직에 대한 독성을 나타내지 않아 인체에 대한 안전성이 우수하므로, 안전한 식품 조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 단일 천연추출물의 ADH의 활성측정 결과를 나타낸 것이고,

도 2는 단일 천연추출물의 ALDH의 활성측정 결과를 나타낸 것이고,

도 3은 단일 천연추출물의 알코올 처리에 의한 알코올 분해 정도를 알코올 농도로 비교한 결과이고,

도 4는 단일 천연추출물의 알코올 처리에 의한 간세포 손상에 대한 보호효과를 확인한 것이고,

도 5는 복합 천연추출물의 알코올 처리에 의한 간세포 손상에 대한 보호효과를 확인한 것이고,

도 6은 복합 천연추출물의 알코올 분해 정도를 혈중 알코올 농도 비교를 통해 확인한 것이고,

도 7은 복합 천연추출물의 in vivo ADH의 활성측정 결과를 나타낸 것이고,

도 8은 복합 천연추출물의 in vivo ALDH의 활성측정 결과를 나타낸 것이고,

도 9는 복합 천연추출물의 LDH 강하효과를 확인한 것이고,

도 10은 복합 천연추출물이 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 본 발명은 불미나리, 콩나물, 인진쑥, 헛개나무 열매, 모과, 갈근, 감초, 감국 및 미숙과 복분자의 복합 추출물을 함유하는, 숙취해소용 및 간기능 보호용 조성물에 관한 것이다.

[0039] 이하, 본 발명에 대해 보다 상세히 설명한다.

[0041] 본 발명의 조성물은 불미나리, 콩나물, 인진쑥, 헛개나무 열매, 모과, 갈근, 감초, 감국 및 미숙과 복분자를 혼합하여 제조되는 복합 추출물을 유효성분으로 포함한다.

[0042] 상기 콩나물은 산소포화수를 이용하여 발아된 것이 선택되는 것이 좋다. 상기 모과는 모과 열매가 선택될 수 있다. 상기 감국은 감국의 꽃이 선택되는 것이 좋다. 상기 미숙과 복분자는 과피가 녹색을 띠는 열매를 의미한다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 복합 추출물에 포함되는 각 천연 추출물의 분리는 열수추출법을 이용하여 수행될 수 있다. 상세하게는, 상기 복합 추출물에 포함되는 각 성분별로 추출원 중량대비 15 내지 30배수의 물을 용매로 첨가하고, 80 내지 100℃, 바람직하게는 90 내지 100℃에서 4 내지 8시간동안 열수추출하여 각 성분별 추출물을 분리할 수 있다. 상기와 같은 조건의 용매 첨가량 및 추출 온도조건 하에서 추출하여 유효성분을 높은 비율로 포함하는 열수 추출물을 제조할 수 있다. 상세하게는, 본 발명에 따른 복합 추출물에 포함되는 불미나리, 콩나물, 인진쑥, 헛개나무 열매, 모과, 갈근, 감초, 감국 및 미숙과 복분자 추출물의 분리가 상기의 용매첨가량, 온도 및 시간 조건 하에 수행되는 경우, 추출 시간을 저감시키면서 고농도, 고효율로 추출물의 분리를 최적화하여 생산성을 증대시킬 수 있다. 또한, 각 성분별 추출물에 포함되는 유효성분의 함량을 극대화함으로써 제조되는 복합 생약 추출물의 효능을 증대시킬 수 있다. 열수 추출을 위해 각 성분별 첨가되는 용매의 함량이 추출원 중량대비 15배수 미만이면 각 천연물에 함유된 유효성분의 추출 함량이 저감될 수 있고, 30배수 초과이면 열수 추출 후 유효성분을 포함하는 추출용액의 농도가 지나치게 낮아 건조 등 후처리에 오랜 시간 및 비용이 소요되는 문제가 발생할 수 있다.

[0044] 상기 분리된 열수 추출물을 공지된 방법에 따라 여과, 감압, 농축 및 건조하여 고형상의 열수 추출물을 제조할 수 있다. 필요에 따라, 열수 추출을 위한 각 성분별 추출원을 통상의 방법에 의하여 절단, 건조 또는 분쇄하여 준비할 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 복합 추출물은, 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 불미나리 10 내지 20wt, 콩나물 15 내지 25wt%, 인진쑥 5 내지 10wt%, 헛개나무 열매 5 내지 15wt%, 모과 1 내지 10wt%, 갈근 1 내지 10wt%, 감초 1 내지 10wt%, 감국 1 내지 10wt% 및 미숙과 복분자 5 내지 15wt%로 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 복합 추출물이 각 성분을 상기의 중량비로 포함하는 경우 우수한 알코올 분해 효소의 활성 증진 효과를 나타내, 숙취해소 효능을 극대화할 수 있다.

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 복합 추출물은 대추, 청피, 진피, 갯기름나물 및 방풍으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 추출물을 더 포함할 수 있다. 이를 통하여, 보다 우수한 숙취해소 또는 간 보호 효과를 나타낼 수 있다. 이 때, 상기 복합 추출물 총 100wt%에 대하여, 상기 대추는 1 내지 10wt%, 상기 청피는 10 내지 15wt%, 상기 진피는 10 내지 15wt%, 상기 갯기름나물은 1 내지 10wt%, 상기 방풍은 1 내지 10wt%의 함량으로 본 발명에 따른 복합 추출물에 포함될 수 있다. 상기 청피 및 상기 진피는 서로 상호 대체약제로 사용할 수 있다. 상기 갯기름나물 및 상기 방풍은 서로 상호 대체약제로 사용할 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 복합 추출물을 포함하는 숙취해소용 및 간기능 보호용 조성물은 그에 포함되는 각 유효성분이 전술한 바와 같은 특징적인 배합비를 가질 때 최적화된 우수한 효과를 나타낼 수 있다. 각 유효성분이 전술한 함량범위를 하한 또는 상한으로 벗어날 경우에는, 각 유효성분이 숙취해소 및 간기능 보호 효과에 미치는 바람직한 조성비를 만족하지 못하게 되어 각 성분별 특성 및 관능성의 상쇄 또는 충돌이 나타나 발명이 목적하는 효과를 나타내기 어려운 문제가 발생할 수 있다. 또한, 각 유효성분이 전술한 함량범위를 상한으로 벗어날 경우에는 제조되는 조성물의 관능성을 저하시켜 쓰거나 씁쓸한 맛을 나타내게 되는 문제가 더 발생할 수 있다.

[0048] 천연원료의 경우 단독으로는 효과를 나타내더라도 동일 효과를 나타내는 천연원료를 단순히 조합한다고 효과가 상승하는 예는 찾아보기 어려우며, 효과에 있어 변화를 나타내지 않는 것을 넘어 서로의 효과를 방해하여 그 효과가 저하되는 경우가 많다. 본 발명은 본 발명에 따른 복합 추출물에 포함되는 천연 추출물들의 특징적인 배합 조건이 만족되는 경우에 음주로 인한 숙취 해소와 간 손상 보호에 모두 현저히 우수한 효과를 나타내는 것에 착안하여 안출된 것이다. 본 발명의 조성물에 있어서, 유효성분으로 포함되는 각 천연 추출물은 전술한 바와 같은 특징적인 배합비로 혼합되어 복합 추출물로 제조되는 경우에 각각 다른 천연 추출물의 작용을 증진시키는 상승작용을 하고, 이를 통하여 상기 천연 추출물을 단독으로 각각 사용한 경우보다 증진된 효과를 발휘하게 된다.

[0049] 본 발명에 따른 복합 추출물을 포함하는 숙취해소용 및 간기능 보호용 조성물은 알코올의 체내 분해에 관여하는 효소의 활성을 증가시킴으로써 숙취증상을 저감시킬 수 있다. 상기 복합 추출물을 포함하는 조성물을 알코올 섭취 전·후로 경구투여하여 숙취증상의 예방, 저감 및 해소 효과를 나타낼 수 있다. 상기 숙취증상으로는 음주후의 갈증, 피로감, 컨디션 저하, 기억력 감퇴, 현기증, 소화 불량, 구토, 설사 등이 포함될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 복합 추출물을 포함하는 조성물은 알코올에 의한 간 손상을 저하시키는 간보호 효과를 가진다. 이를 통하여, 알코올에 의하여 유발되는 간질환에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다. 상기 간질환으로는 예를 들면, 비알코올성 지방간(non alcoholic fatty liver disease), 지방간, 알코올성 지방간, 알코올성 간염, 급성 지방간, 및 간경변증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에 따른 복합 추출물을 포함하는 조성물은 식품 조성물로 제조될 수 있다. 상기 식품 조성물이란 복합 추출물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 경구투여를 위한 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 것을 의미한다. 상기 식품 조성물의 형태는 경구투여되는 물질이라면 특별하게 한정되지 않으며, 예를 들면, 분말, 과립, 정제, 캅셀 또는 음료의 형태일 수 있다.

[0051] 필요에 따라, 본 발명의 복합 추출물을 포함하는 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 아미노산, 탄수화물, 지방, 비타민 및 영양소를 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 숙취 해소 및 간 보호 효능을 보다 향상시키기 위한 측면에서, 본 발명의 복합 추출물을 포함하는 조성물은 매실 등의 원액 또는 농축액을 더 포함할 수 있다. 상기 농축액은 공지된 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들면, 원료를 열수추출, 설탕절임 추출 또는 원액 착즙하여 얻은 추출물을 농축하여 제조될 수 있다. 상기 농축은 농축기를 이용한 진공 저온농축, 고온농축, 감압농축 또는 동결농축 방법을 통해 수행될 수 있으며, 제조되는 농축액 용량이 농축 전 추출물 용량의 50%(v/v) 이하가 되도록 농축되는 것이 바람직하고, 20 내지 200 브릭스 일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 또한, 섭취시의 기호도를 향상시키기 위한 측면에서, 본 발명의 복합 추출물을 포함하는 조성물은 과일 원액 또는 농축액, 감초 원액 또는 농축액, 감미제 등을 더 포함할 수 있다. 상기 감미제로는 예를 들면, 벌꿀, 아가베시럽, 결정과당, 구연산 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상품성을 향상시키고 웰빙-친환경 트렌드에 부합하는 제품을 제조하기 위하여, 합성착향료 또는 보존료는 포함하지 않는 것이 바람직하다. 복합 생약 추출물 및 상기의 통상적으로 첨가되는 성분을 혼합하여 본 발명의 복합 생약 추출물을 포함하는 조성물을 제조할 수 있다.

[0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 좀 더 상세하게 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 첨부된 특허청구범위를 제한하는 것이 아니며, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 실시예에 대한 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[0056] **실시예**

[0057] <천연 추출물 농축원액 제조>

[0058] [제조예 1] 대추 추출물의 제조

[0059] 대추 열매를 깨끗하게 세정 후 물기를 제거하고 그늘에서 건조시켰다. 건조된 대추를 파쇄하거나 또는 그대로 사용하여, 대추 원료 중량의 20배의 물과 함께 추출기에 담아 90~100℃에서 6시간 추출을 진행하였다, 이를 여과기를 통하여 여과시켜 찌꺼기는 버리고 이로부터 얻은 상층액을 진공가열 농축하여 20 브릭스(Brix)까지 농축

하여 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0061] [제조예 2] 모과 추출물의 제조

[0062] 모과를 원료로 하되, 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0064] [제조예 3] 헛개나무 열매 추출물의 제조

[0065] 헛개나무 열매를 원료로 하되, 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0067] [제조예 4] 미숙과 복분자 추출물의 제조

[0068] 미숙과 복분자 열매를 원료로 하되, 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 추출농축물 원액을 수득하였다. 상기 미숙과 복분자 열매는, 과피가 녹색을 나타내는 것을 선별하여 사용하였다.

[0070] [제조예 5] 산소포화수 발아 콩나물 추출물의 제조

[0071] 산소포화수로 발아 및 재배한 콩나물을 추출하기 하루 전에 검은 암막을 제거하고 햇볕에서 하루 동안 재배하여 콩나물 머리가 푸른색을 띄게 한 콩나물을 추출에 사용하였다. 수확한 콩나물을 그대로 사용하여 콩나물 중량기준 20배의 물과 함께 추출기에 담아 90~100℃에서 6시간 추출을 진행하였다, 이를 여과기를 통하여 여과시켜 찌꺼기는 버리고 이로부터 얻은 상층액을 진공가열 농축하여 20 브릭스(Brix)까지 농축하여 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0073] [제조예 6] 불미나리 추출물의 제조

[0074] 줄기가 붉은색인 불미나리의 줄기와 잎을 수확하여 깨끗이 세정한 후 물기를 없애고 그늘에서 건조시켰다, 건조된 불미나리를 10cm 길이로 절단하거나 또는 그대로 원료로 사용하여 불미나리 원료 중량기준 20배의 물과 함께 추출기에 담아 90~100℃에서 6시간 추출을 진행하였다, 이를 여과기를 통하여 여과시켜 찌꺼기는 버리고 이로부터 얻은 상층액을 진공가열 농축하여 20 브릭스(Brix)까지 농축하여 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0076] [제조예 7] 인진쑥 추출물의 제조

[0077] 인진쑥을 원료로 하되, 상기 제조예 6과 동일한 방법으로 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0079] [제조예 8] 갯기름나물 추출물의 제조

[0080] 갯기름나물을 원료로 하되, 상기 제조예 6과 동일한 방법으로 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0082] [제조예 9] 청피 추출물의 제조

[0083] 미숙과 감귤을 수확하여 깨끗이 세정한 후 물기를 없앤 후 껍질을 취하여 1cm 두께로 절단하여 그늘에서 건조시킨 것을 청피로 사용하였다. 건조된 청피를 사용하여 청피 중량기준 20배의 물과 함께 추출기에 담아 90~100℃에서 6시간 추출을 진행하였다, 이를 여과기를 통하여 여과시켜 찌꺼기는 버리고 이로부터 얻은 상층액을 진공가열 농축하여 20 브릭스(Brix)까지 농축하여 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0085] [제조예 10] 진피 추출물의 제조

[0086] 완숙과 감귤에서 취한 껍질을 진피 원료로 사용하되, 상기 제조예 9와 동일한 방법으로 추출농축물 원액을 수득

하였다.

[0088] [제조예 11] 방풍 추출물의 제조

[0089] 방풍 뿌리를 수확하여 깨끗이 세정한 후 물기를 없앤 후 3㎝ 두께로 절단하여 그늘에서 건조시킨 것을 방품 원료로 사용하였다. 건조된 방풍을 사용하여 방풍 중량기준 20배의 물과 함께 추출기에 담아 90~100℃에서 6시간 추출을 진행하였다, 이를 여과기를 통하여 여과시켜 찌꺼기는 버리고 이로부터 얻은 상층액을 진공가열 농축하여 20 브릭스(Brix)까지 농축하여 추출농축물 원액을 얻었다.

[0091] [제조예 12] 갈근 추출물의 제조

[0092] 갈근을 원료로 하되, 상기 제조예 11과 동일한 방법으로 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0094] [제조예 13] 감초 추출물의 제조

[0095] 감초를 원료로 하되, 상기 제조예 11과 동일한 방법으로 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0097] [제조예 14] 감국화 꽃 추출물의 제조

[0098] 감국의 꽃을 수확하여 깨끗이 세정한 후 물기를 없앤 후 그늘에서 건조시킨 것을 원료로 사용하였다. 건조된 감국을 사용하여 감국 원료 중량기준 20배의 물과 함께 추출기에 담아 90~100℃에서 6시간 추출을 진행하였다, 이를 여과기를 통하여 여과시켜 찌꺼기는 버리고 이로부터 얻은 상층액을 진공가열 농축하여 20 브릭스(Brix)까지 농축하여 추출농축물 원액을 수득하였다.

[0100] [제조예 S1 내지 S6] 천연 혼합 추출물의 제조

[0101] 상기 제조예들의 천연 원료, 상세하게는 대추 건조물, 불미나리 건조물, 산소포화수 발아 콩나물, 인진쑥 건조물, 청피 건조물, 진피 건조물, 헛개나무 열매 건조물, 모과 건조물, 갈근 건조물, 감초 건조물, 방풍 뿌리 건조물, 갯기름나물 잎 가지 건조물, 감국 꽃 건조물 및 미숙과 복분자 건조물을 하기 표 1과 같은 조성비로 혼합하여 추출 원료로 사용하였다. 원료인 배합물 중량의 20배의 물과 함께 추출기에 담아 90~100℃에서 6시간 추출을 진행하였으며, 이를 여과기를 통하여 여과시켜 찌꺼기는 버리고 이로부터 얻은 상층액을 진공가열 농축하여 20 브릭스(Brix)까지 농축하여 추출농축물 원액을 수득하였다. 하기 표 1에서, 조성비는 원료 중량비(wt%)를 의미한다.

표 1

[0103]

원료명	조성비 (%)					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6
대추	0%	0	5%	0%	4%	0%
불미나리	15%	15%	15%	15%	15%	15%
콩나물	20%	20%	20%	20%	20%	20%
인진쑥	8%	10%	0%	8%	8%	8%
청피	13%	13%	13%	0%	13%	13%
진피	0%	0%	0%	13%	0%	0%
헛개	10%	10%	10%	10%	9%	10%
모과	6%	6%	6%	6%	5%	6%
갈근	4%	5%	5%	4%	3.5%	4%
감초	4%	5%	5%	4%	3.5%	4%
갯기름나물	5%	0%	5%	5%	5%	0%
방풍	0%	0%	0%	0%	0%	5%
감국화	5%	6%	6%	5%	5%	5%

미숙과 복분자	10%	10%	10%	10%	9%	10%
합계	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**	**100%**

[0105] <단일 추출농축물의 알코올 탈수소효소(ADH) 및 아세트알데히드 탈수소효소(ALDH)활성 측정>

[0106] 상기 제조예 1 내지 14의 단일 추출물을 대상으로, 천연물질 각각을 추출 농축한 물질이 숙취해소 효능이 있는지를 탐색하기 위하여 숙취해소 효능에 가장 중요한 인자인 ADH와 ALDH의 활성을 시험관 내 (*in vitro*)에서 측정하였다. 효소는 동결건조된 S9 rat liver homogenate (MOLTOX Co., USA)를 0.1% 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin) 용액 8 ml에 녹여 0.45 ㎛ 주사 필터(syringe filter)로 여과한 후 사용하였다.

[0107] ADH의 활성측정은 흡광도 340nm에서 NADH의 생성속도를 지표로 사용하였으며, 반응액의 조성은 증류수 1.4 ml, 1.0 M 트리스-HCl 완충액(tris-HCl buffer)(pH 8.8) 0.75 ml, 20 mM NAD+0.3 ml, 에탄올(ethanol) 0.3 ml, 추출농축물 0.1 ml의 혼합액과 효소 0.15 ml를 큐벳에 넣어 총 3ml이 되도록 하였다. 시료를 30℃에서 5분간 전처리 한 후, 340nm에서 5분 동안 흡광도 변화를 측정하였다. 이때, 시료를 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하였으며, 시료의 ADH활성은 표준검량선에 대입하여 농도(mU/ml)로서 측정하였다. 상기 제조예1 내지 14을 시료로 사용하였으며, 각각 1 내지 10 mg/ml로 처리하여 ADH의 활성을 측정하였으며, 측정 결과는 도 1에 나타냈다. 도 1에 표시된 시료 번호 1 내지 14의 의미는 하기 표 2에 정리하였다. 도 1에 있어서, CTL은 대조군을 의미하며, 1 내지 14의 숫자 시료는 좌측부터 순서대로 대추 추출물, 불미나리 추출물, 콩나물 추출물, 인진쑥 추출물, 청피 추출물, 진피 추출물, 헛개나무 열매 추출물, 모과 추출물, 갈근 추출물, 감초 추출물, 방풍 추출물, 갯기름나물 추출물, 감국 추출물 및 미숙과 복분자 추출물을 의미한다. 또한, 도 1에 있어서, 각 실험군 시료별로 좌측은 1mg/ml, 우측은 10mg/ml 농도로 처리한 실험군을 의미한다.

표 2

[0109]

번호	**추출물 원료**	**번호**	**추출물 원료**
1	**대추**	8	**모과**
2	**불미나리**	9	**갈근**
3	**산소포화수 콩나물**	10	**감초**
4	**인진쑥**	11	**방풍**
5	**청피**	12	**갯기름나물**
6	**진피**	13	**감국**
7	**헛개나무 열매**	14	**미숙과 복분자**

[0111] 도 1을 보면, ADH 활성에 있어 유의적인 효과를 나타낸 것은 미숙과 복분자, 갯기름나물, 불미나리, 콩나물, 인진쑥, 방풍, 헛개나무 열매 및 갈근 추출물 순으로 나타났으며, 나머지 추출물에서는 그 효과가 미약하였다.

[0112] ALDH의 활성측정은 흡광도 340nm에서 NADH의 생성속도를 지표로 사용하였으며, 반응액의 조성은 증류수 2.1 ml, 1.0 M 트리스-HCl 완충액(pH 8.0) 0.3 ml, 20 mM NAD+0.1 ml, 1.0 M 아세탈디하이드(acetaldehyde) 0.1 ml, 3.0 M KCl 0.1 ml, 0.33 M 2-메르캅토에탄올(mercaptoethanol) 0.1 ml, 추출농축물 0.1 ml의 혼합액과 효소 0.1 ml를 큐벳에 넣어 총 3ml이 되도록 하였다. 시료를 30℃에서 5분간 전처리 한 후, 340nm에서 5분 동안 흡광도 변화를 측정하였다. 이때, 시료를 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하였으며, 시료의 ALDH활성은 표준검량선에 대입하여 농도(mU/ml)로서 측정하였다. ALDH의 활성측정 결과는 도 2에 나타냈다. 도 2에 표시된 시료 번호 1 내지 14의 의미는 상기 표 2에 정리된 바와 같다. 도 2에 있어서, CTL은 대조군을 의미하며, 1 내지 14의 숫자 시료는 좌측부터 순서대로 대추 추출물, 불미나리 추출물, 콩나물 추출물, 인진쑥 추출물, 청피 추출물, 진피 추출물, 헛개나무 열매 추출물, 모과 추출물, 갈근 추출물, 감초 추출물, 방풍 추출물, 갯기름나물 추출물, 감국 추출물 및 미숙과 복분자 추출물을 의미한다. 또한, 각 실험군 시료별로 좌측은 1mg/ml, 우측은 10mg/ml 농도로 처리한 실험군을 의미한다.

[0113] 도 2를 보면, ALDH 활성에 있어 유의적인 효과를 나타내는 추출물은 방풍, 갯기름나물, 미숙과 복분자, 불미나

리 및 헛개나무 열매 추출물 순으로 나타났으며, 나머지 추출물에서는 그 효과가 미약하였다. ALDH 활성이 강한 추출농축물은 모두 ADH에서도 활성이 높게 나타났으며, 특이적으로 ADH 활성만 높여주는 추출물인 콩나물, 인진쑥 및 갈근 추출물에 의해 복합물을 조성하였을 경우 더욱 시너지가 높은 생체 내(*in vivo*) 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

[0115] <단일 추출농축물의 알코올 농도 측정을 통한 알코올 분해효과 확인(*in vitro*)>

[0116] 6주령의 스프라그-다울리(Sprague-Dawley(SD))계의 수컷 흰쥐를 중앙실험동물로부터 구입하여 간 조직을 분리하고 트립신을 처리하여 간 세포를 분리시키고 각 well 당 1x 10^5 cells/ml로 조절하여 100 μl씩 well에 넣은 다음 CO_2 incubator에서 24시간 예비 배양하였다. 배지를 제거한 후 상기 제조예 1 내지 14의 천연 단일 추출 농축물과 알코올을 농도별로 처리한 다음 CO_2 incubator에서 6시간 동안 배양한 후, 알코올 농도를 측정하기 위하여 알코올 농도 측정용 킷트 (시그마사, 미국, 337A)를 이용하였다. 측정 결과는 도 3에 나타냈다. 도 3에 표시된 시료 번호 1 내지 14의 의미는 상기 표 2에 정리된 바와 같다. 도 3에 있어서, CTL은 대조군을 의미하며, 1 내지 14의 숫자 시료는 좌측부터 순서대로 대추 추출물, 불미나리 추출물, 콩나물 추출물, 인진쑥 추출물, 청피 추출물, 진피 추출물, 헛개나무 열매 추출물, 모과 추출물, 갈근 추출물, 감초 추출물, 방풍 추출물, 갯기름나물 추출물, 감국 추출물 및 미숙과 복분자 추출물을 의미한다. 또한, 각 실험군 시료별로 좌측은 1mg/ml, 우측은 10mg/ml 농도로 처리한 실험군을 의미한다.

[0117] 도 3을 보면, 일차배양한 건강한 간 세포에 각각의 추출농축물을 처리 후 알코올을 처리하였을 때, 간세포에서 알코올을 분해한 효과를 측정한 결과 불미나리, 헛개나무 열매, 방풍, 갯기름나물 및 미숙과 복분자 추출물을 시료로 이용한 경우에 유의적으로 알코올 수치를 낮추는 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있다. 또한 콩나물, 인진쑥 및 갈근 추출물도 비교적 유의적으로 알코올 수치를 낮추는 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다, 이러한 결과를 고려하면, 이전 수행한 실험에서 ADH 및 ALDH 활성을 증가시켜주는 효과를 나타났던 천연 추출물에서 주로 알코올 농도를 낮춰주는 것으로 나타나, 숙취해소제 개발을 위해서는 전술한 실험 결과에서 유의적으로 효과가 있는 추출물의 첨가가 필요할 것으로 여겨진다.

[0119] <단일 추출농축물의 알코올 처리에 의한 간 손상에 대한 보호효과 측정(*in vitro*)>

[0120] 6주령의 스프라그-다울리(Sprague-Dawley(SD))계의 수컷 흰쥐를 중앙실험동물로부터 구입하여 간 조직을 분리하고 트립신을 처리하여 세포를 분리시키고 각 well 당 1x 10^5 cells/ml로 조절하여 100 μl씩 well에 넣은 다음 CO_2 incubator에서 24시간 예비 배양하였다. 배지를 제거한 후 천연 단일 추출 농축물과 알코올을 농도별로 처리한 다음 CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 후, MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 세포 생존율의 측정을 위한 MTT assay는 Sladowski 등의 방법(Sldowski D., Steer S. J., Clothier R.H., Balls M., An improved MTT assay. J. Immun. Methods, 1993, 157, 203, 207)을 따라 행하였다. 간세포를 배양시킨 96 well plate에 PBS에 용해한 MTT 용액 (5g/ml)을 가하고, CO_2 incubator에서 2시간 방치한 다음 상등액을 제거한 뒤 DMSO : EtOH (1:1 v/v)를 well 당 100 μl씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 천연 단일 추출농축물의 알코올에 의한 간세포 손상의 보호 효과를 규명하기 위해, 상기 제조예 1 내지 14를 시료로 하여 일차배양한 간 세포에 농도별로 전처리한 다음, 알코올을 1mM이 되도록 첨가하고 다시 12시간 배양한 후, 세포 생존율을 MTT assay로 관찰하고 그 결과를 도 4에 나타냈다. 도 4에 표시된 시료 번호 1 내지 14의 의미는 상기 표 2에 정리된 바와 같다. 도 4에 있어서, CTL은 대조군을 의미하며, 1 내지 14의 숫자 시료는 좌측부터 순서대로 대추 추출물, 불미나리 추출물, 콩나물 추출물, 인진쑥 추출물, 청피 추출물, 진피 추출물, 헛개나무 열매 추출물, 모과 추출물, 갈근 추출물, 감초 추출물, 방풍 추출물, 갯기름나물 추출물, 감국 추출물 및 미숙과 복분자 추출물을 의미한다. 또한, 각 실험군 시료별로 좌측은 1mg/ml, 우측은 10mg/ml 농도로 처리한 실험군을 의미한다.

[0121] 도 4를 보면, 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, 알코올만을 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 52.46%로 현저하게 감소하는 것으로 나타났으며 이를 통해 알코올에 의하여 간 세포가 산화

적 손상을 받아 괴사되는 것을 확인할 수 있었다. 이에 비하여, 각 제조예의 시료를 well당 1, 10 mg/ml씩 농도별로 전 처리한 다음 알코올을 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 상세하게는, 방풍(110.0%), 갯기름나물(104.3%), 감국(96.0%), 대추(98.72%), 청피(96.72%), 모과(94.72%) 및 진피(90.0%) 추출물을 처리한 결과에서 매우 유의적으로 높은 간세포 보호 효과를 확인할 수 있었으며, 콩나물(72.0%), 불미나리(84.0%), 헛개나무 열매(80.72%), 감초(80.7%), 갈근(70.0%) 및 미숙과 복분자(78.0%) 추출물을 처리한 결과에서도 유의적인 간세포 보호효과를 볼 수 있었다. 대추, 청피, 진피, 모과, 감초 및 감국 추출물은 ADH 또는 ALDH 효소활성과 관계없이 자체적으로 알코올에 의한 간세포 손상을 보호하는 효과를 나타냈으며, 이러한 각각의 단일 추출물을 조합하였을 경우 ADH, ALDH 효소활성과 더불어 간세포 보호에도 강력한 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

[0123] <복합 추출농축물의 알코올 처리에 의한 간 손상에 대한 보호효과 측정(*in vitro*)>

[0124] 6주령의 스프라그-다울리(Sprague-Dawley(SD))계의 수컷 흰쥐를 중앙실험동물로부터 구입하여 간 조직을 분리하고 트립신을 처리하여 간 세포를 분리시키고 각 well 당 1x 10^5 cells/ml로 조절하여 100 μl씩 well에 넣은 다음 CO_2 incubator에서 24시간 예비 배양하였다. 배지를 제거한 후 복합추출 농축물과 알코올을 농도별로 처리한 다음 CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 후, MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 세포 생존율의 측정을 위한 MTT assay는 Sladowski 등의 방법(Sldowski D., Steer S. J., Clothier R.H., Balls M., An improved MTT assay. J. Immun. Methods, 1993, 157, 203, 207)을 따라 행하였다. 간세포를 배양시킨 96 well plate에 PBS에 용해한 MTT 용액 (5g/ml)을 가하고, CO_2 incubator에서 2시간 방치한 다음 상등액을 제거한 뒤 DMSO : EtOH (1:1 v/v)를 well 당 100 μl씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide)가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 복합추출농축물의 알코올에 의한 간세포 손상의 보호 효과를 규명하기 위해, 상기 제조예 S1 내지 S6을 시료로 하여, 일차배양한 간 세포에 농도별로 각 시료를 전처리한 다음, 알코올을 1mM이 되도록 첨가하고 다시 12시간 배양한 후, 세포 생존율을 MTT assay로 관찰하고 그 결과를 도 5에 나타냈다. 도 5에 있어서, CTL 및 EtOH는 각각 미처리군 및 알코올처리군의 대조군을 의미한다. 또한, 각 실험군 시료별로 좌측은 25%(wt%), 우측은 50%(wt%) 농도로 처리한 실험군을 의미한다.

[0125] 도 5를 보면, 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, 알코올만을 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 59.93%로 현저하게 감소하는 것으로 나타나, 이 결과에서 알코올에 의하여 간세포가 산화적 손상을 받아 괴사되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 시료로 복합추출물을 well당 1, 10 mg/ml씩 농도별로 전처리한 다음 알코올을 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 상세하게는, S1(106.6%), S5(108.7%) 및 S6(109.7%)의 시료를 처리한 실험군에서 매우 유의적으로 증대된 간세포 보호 효과를 확인할 수 있었으며, S4(84.78%)의 시료를 처리한 실험군에서도 유의적으로 향상된 간세포 보호효과를 볼 수 있었다. 그러나, S2(74.93%) 및 S3(82.73%)를 전처리한 실험군에서는 알코올에 의한 간세포의 보호교과가 미약하게 나타났다. 천연원료의 경우, 단독으로는 효과를 나타내더라도 조합 시 서로의 효과를 방해하여 효과가 저하되거나 효과의 상승을 나타내지 않는 경우가 많기 때문에, 본 발명에 따른 복합추출물의 특징적인 배합조건이 완성되어야만 현저한 상승효과를 나타낼 수 있는 것으로 예측되었으며, 본 실험 결과를 통해, 실제로 간 손상 전반에 대해 우수한 약효를 나타내는 천연물 성분들을 특징적인 배합비로 혼합하는 경우에 각 천연물의 상호 보완적인 효과가 발생하여 단일 추출물보다 현저하게 향상된 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0127] <복합 추출농축물의 간 보호 및 숙취해소 효과 측정>

[0128] 본 발명에 따른 복합 추출물의 간 보호 및 숙취해소 효과를 측정하기 위하여, 알코올을 섭취한 실험동물에 상기 제조예 S1 내지 S6의 조성물을 시료로 투여하여 혈중 알코올 농도를 측정하였다.

[0129] 6주령의 스프라그-다울리(Sprague-Dawley(SD))계의 수컷 흰쥐를 중앙실험동물 로부터 구입하여 각 처리구당 7마리씩 선별하여 음용수만 제공하고 24시간 동안 절식시킨 후 40% 에탄올을 스테인레스 스틸 존데 (길이, 10 ㎝)를 사용하여 강제 경구 투여하였다. 40%(v/v) 에탄올을 마우스당 10 ㎖/kg을 경구투여하고 1시간째에 음성대조군에는 물만 10 ㎖/kg을 투여하였고 양성대조군에는 시중에 판매되는 숙취음료를 10 ㎖/kg을 투여하였다. 자세

한 실험군은 하기 표 3과 같이 구성하였다.

표 3

[0131]

시험군		투여 방법
음성 대조군		물 투여 (10ml/kg)
알코올 단독 투여군		알코올 40% 투여
복합 조성물 투여군	S1 조합군	알코올 40% + S1조합물(150㎕/kg)
	S2 조합군	알코올 40% + S1조합물(150㎕/kg)
	S3 조합군	알코올 40% + S1조합물(150㎕/kg)
	S4 조합군	알코올 40% + S1조합물(150㎕/kg)
	S5 조합군	알코올 40% + S1조합물(150㎕/kg)
	S6 조합군	알코올 40% + S1조합물(150㎕/kg)
양성대조군		알코올 40% + 시중 제품(150㎕/kg)

[0133] 각 실험군에서 시료는 각각 150 ㎕/kg 농도로 하여 10 ㎖/kg을 경구 투여하였다. 양성대조군으로는 숙취해소로서 한국 시장점유율이 가장 높은 여명 808 (그래미사)을 비교대상으로 사용하였다. 경구투여 후 30분, 1, 2, 4 시간째에는 안와채혈을 하였고 마지막 8시간째에는 심장으로부터 혈액을 채혈하였으며, 혈중 알콜농도를 측정하기 위하여 알콜농도 측정용 킷트 (시그마사, 미국, 337A)를 이용하고 그 결과를 도 6에 나타냈다.

[0134] 도 6을 보면, 본 발명에 따른 복합 추출물을 투여하지 않은 대조군의 혈중 알코올 농도와 비교하였을 때, 상기 제조예 S1 내지 S6의 모든 조성물이 투여된 실험군의 혈중 알콜농도가 알코올 투여 8시간 후에 10 mM 이하로 감소하는 것을 알 수 있었으며, 이를 통하여 본 발명에 따른 간 보호 및 숙취해소용 조성물은 알코올 분해능이 우수하고 숙취해소 효과가 뛰어난 것을 확인하였다. S5 조성물(5.74 mM) 과 S6 조성물 (5.90 mM)에서는 시중에서 판매되고 있는 숙취음료(6.89 mM)보다 현저히 우수한 효과를 나타냈다.

[0135] S1, S5 및 S6 복합 조성물은 알코올에 의한 간 세포 손상의 보호에서도 동일하게 우수한 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, 이를 통하여 상기 세가지 조성물은 간 보호 및 알코올 분해 효과를 동시에 갖는 특징적인 복합 추출물의 배합비가 적용된 조성물인 것을 확인할 수 있었다.

[0137] <복합 추출농축물의 간 조직에서 ADH, ALDH 및 LDH 강하효과 측정>

[0138] 본 발명에 따른 조성물의 간 보호 및 숙취해소 효과를 측정하기 위하여, 알코올을 섭취한 실험동물에 상기 제조예 S1 내지 S6의 조성물을 투여하여 알코올 대사에 관여하는 효소들 및 간 세포 손상 정도를 측정하였다.

[0139] 6주령의 흰쥐 (SD-Rat, 중앙실험동물 구입) 각 처리구당 7마리씩 선별하여 음용수만 제공하고 24시간 동안 절식시킨 후 40% 에탄올을 스테인레스 스틸 존데 (길이, 10 ㎝)를 사용하여 강제 경구 투여하였다. 40% 에탄올을 마우스당 10 ㎖/kg을 경구투여하고 1시간째에 음성대조군에는 물만 10 ㎖/kg을 투여하였고 양성대조군에는 시중에 판매되는 숙취음료를 10 ㎖/kg을 투여하였다.

[0140] 실험군으로는 상기 제조예 S1 내지 S6의 조성물을 시료로 각각 150 ㎕/kg 농도로하여 10 ㎖/kg을 경구 투여하였다. 경구투여 후 8시간째에 간 조직을 적출하고 ADH, ALDH 및 LDH 측정 킷트를 이용하여 시료 내 ADH, ALDH 및 LDH를 측정하였다. 알코올이 대사되어 빠르게 분해가 되는 정도는 ADH 및 ALDH 효소의 활성이 높아질수록 혈중 알코올 농도가 낮아져 숙취에 효과가 있음을 나타내며, 또한 LDH는 간 독성에 대한 간장 보호효과를 나타내는 것으로 간에서 LDH의 분비가 적을수록 간장이 보호되고 있음을 나타낸다. 간 조직에서의 ADH 효소활성 측정결과는 도 7에, ALDH 효소활성 측정결과는 도 8에, LDH 강하효과 측정결과는 도 9에 나타냈다. 도 7 내지 9에 있어서, 도 5에 있어서, CTL 및 EtOH는 각각 미처리군 및 알코올처리군의 대조군을 의미한다. 또한, 각 실험군 시료별로 좌측은 25%(wt%), 우측은 50%(wt%) 농도로 처리한 실험군을 의미한다.

[0141] 도 7을 보면, 알코올 섭취에 의해 ADH 효소활성이 0.002 mU/ml로 급격하게 효소활성이 억제되는 것을 알 수 있으며, S1 복합물(0.01 mU/ml), S5 복합물(0.011 mU/ml) 및 S6 복합물(0.011 mU/ml)을 각각 처리한 실험군에서 각 시료가 ADH 효소를 강하게 활성화시키는 것을 볼 수 있었다. 또한, S4 복합물에서도 유의적으로 0.009 mU/ml

농도로 ADH 효소를 활성화 시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0142] 도 8을 보면, 알코올 섭취에 의해 ALDH 효소활성이 0.001 mU/ml로 급격하게 억제되는 것으로 나타났으나, S1 복합물(0.024 mU/ml), S5 복합물(0.027 mU/ml) 및 S6 복합물(0.026 mU/ml)을 각각 시료로 처리한 실험군에서 각 시료가 ALDH 효소를 강하게 활성화 시키는 것을 볼 수 있었다. 또한, S4 복합물에서도 유의적으로 0.021 mU/ml 농도로 ALDH 효소를 활성화시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0143] 도 9를 보면, 본 발명에 따른 복합 추출물을 투여하지 않은 대조군의 LDH농도는 112.9%로 급격하게 증가하여 간세포가 손상되었음을 확인할 수 있는 반면, 본 발명에 따른 복합 추출물을 시료로 처리한 군에서는 유의적인 수준으로 우수한 간 보호 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 상세하게는, S1 조성물(78.95%) S5 조성물(75.77%)과 S6 조성물(73.42%)에서는 유의적인 수준으로 현저히 우수한 간 보호 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0144] 알코올 대사 뿐만 아니라 알코올에 의한 간세포 손상의 보호 효과까지 확인한 결과, 본 발명에 따른 복합 천연생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 알코올 분해를 통한 숙취해소 능력뿐만 아니라 알코올에 의한 간 손상의 보호 효과까지 가지는 것으로 나타났다.

[0146] <복합 추출농축물의 세포독성 확인>

[0147] 본 발명의 복합 추출물이 세포에 독성을 나타내지 않으며, 세포 사멸을 유도하지 않는 것을 확인하기 위한 세포독성 검사를 수행하였다. 복합 추출물의 세포 독성은 간 세포주를 대상으로 측정하였으며, 알코올을 처리하지 않은 것을 제외하면 알코올 처리에 의한 간 손상에 대한 보호효과 측정을 위한 실험과 동일하게 수행하였다. 6주령의 스프라그-다울리(Sprague-Dawley(SD))계의 수컷 흰쥐를 중앙실험동물로부터 구입하여 간 조직을 분리하고 트립신을 처리하여 간 세포를 분리시키고 각 well 당 1x 10^5 cells/ml로 조절하여 100 μl씩 well에 넣은 다음 CO_2 incubator에서 24시간 예비 배양하였다. 배지를 제거한 후 복합추출 농축물을 농도별로 처리한 다음 CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 후, MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 세포 생존율의 측정을 위한 MTT assay는 Sladowski 등의 방법(Sldowski D., Steer S. J., Clothier R.H., Balls M., An improved MTT assay. J. Immun. Methods, 1993, 157, 203, 207)을 따라 행하고 그 결과를 도 10에 도시하였다. 도 10에서, 각 실험군 시료별로 두 개 농도로 처리하여 결과를 확인하였으며, 좌측은 25%(wt%), 우측은 50%(wt%) 농도로 처리한 실험군을 의미한다.

[0148] 도 10을 참고하면, 본 발명에 따른 복합 추출물은 처리한 모든 농도에서 간세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0150] <숙취해소용 음료의 제조>

[0151] 하기 표 4의 조성으로 간기능 보호 및 숙취해소용 음료를 제조하였다. 하기 표 4에서, 복합 추출 농축물은 상기 제조예 S1 내지 S6 중 선택되는 하나이고, 함유량은 제조되는 음료 중량 총 100wt%에 대한 각 구성성분별 중량비 범위(wt%)를 의미한다.

표 4

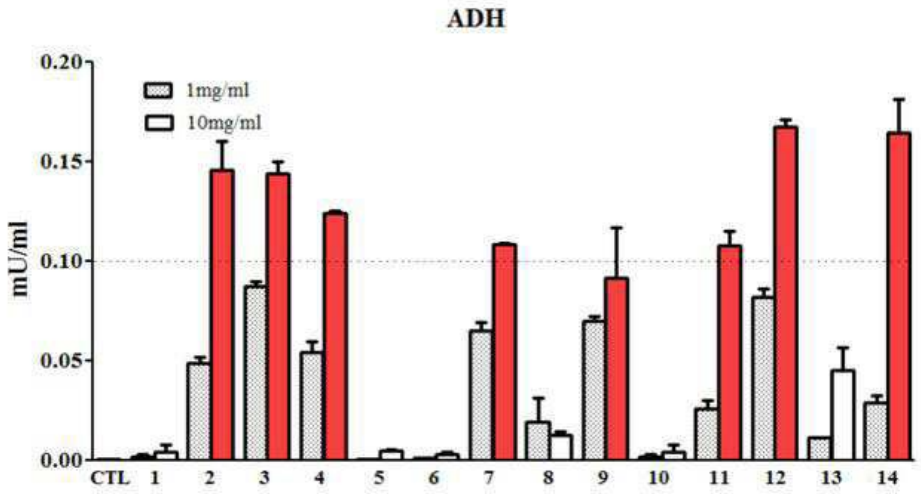
[0153]

구성성분	함유량 (%)
복합 추출 농축물 (20 brix)	15 ~ 35
벌꿀	5 ~ 15
감미제	2 ~ 5
정제수	45 ~ 78

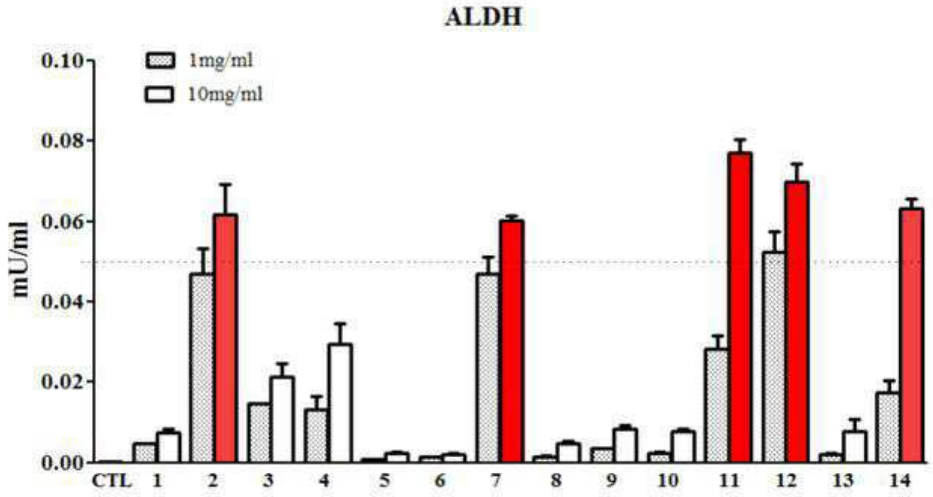
[0155] 상기 표 4의 조성비로 제조된 음료는 우수한 관능성을 가지는 것으로 나타났다.

도면

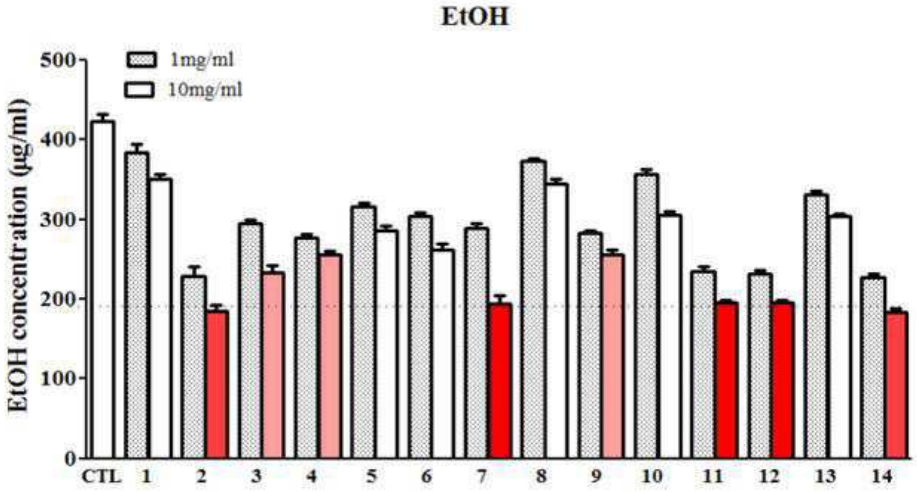
도면1


ADH
1mg/ml
10mg/ml
mU/ml
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
CTL 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

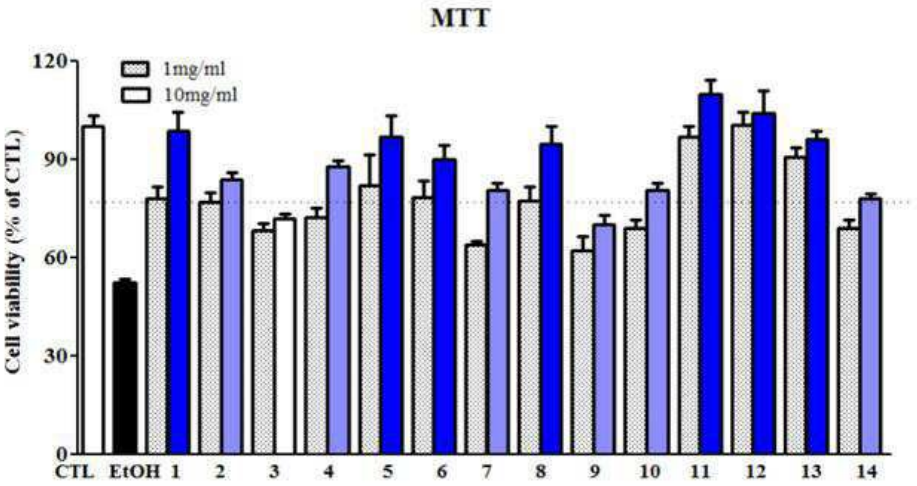
도면2


ALDH
1mg/ml
10mg/ml
mU/ml
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
CTL 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

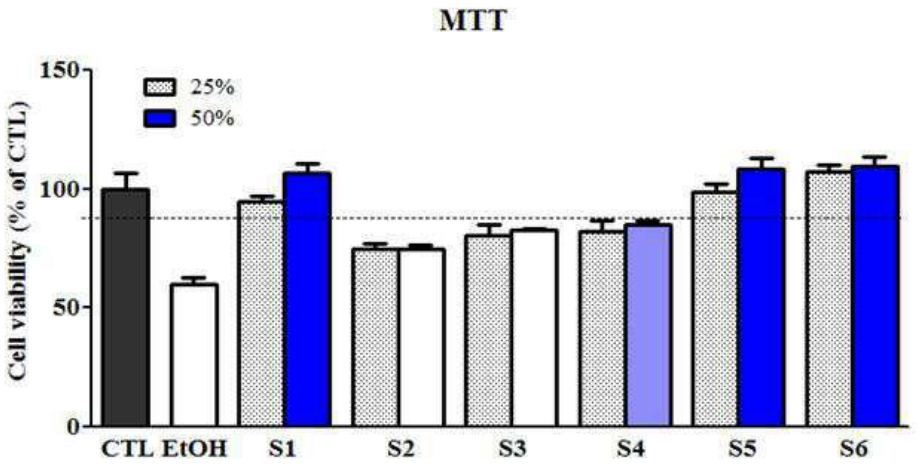
도면3


EtOH
1mg/ml
10mg/ml
EtOH concentration (μg/ml)
500
400
300
200
100
0
CTL 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

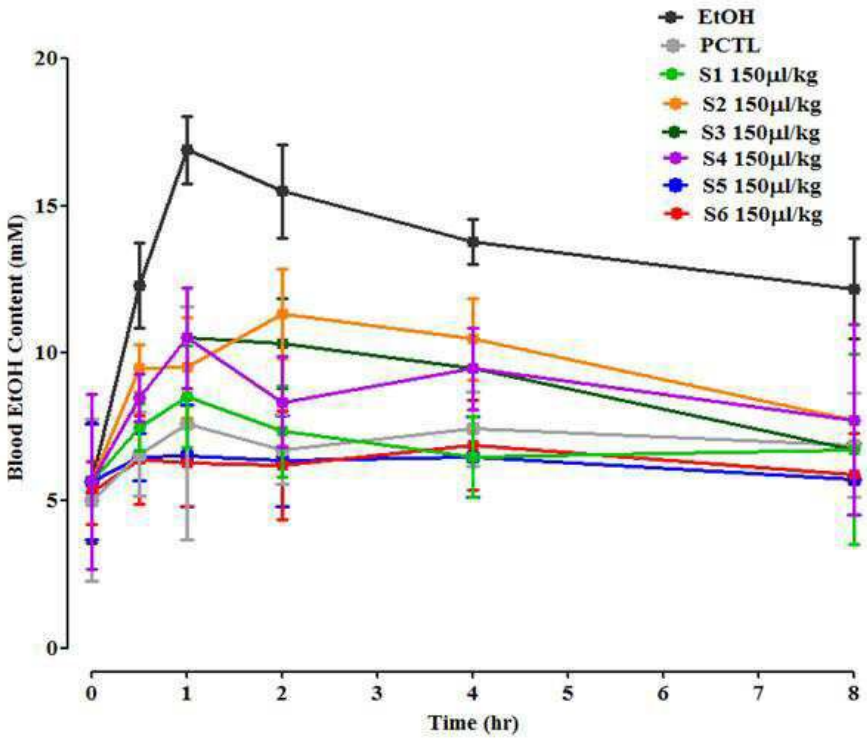
도면4


MTT
1mg/ml
10mg/ml
Cell viability (% of CTL)
120
90
60
30
0
CTL EtOH 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

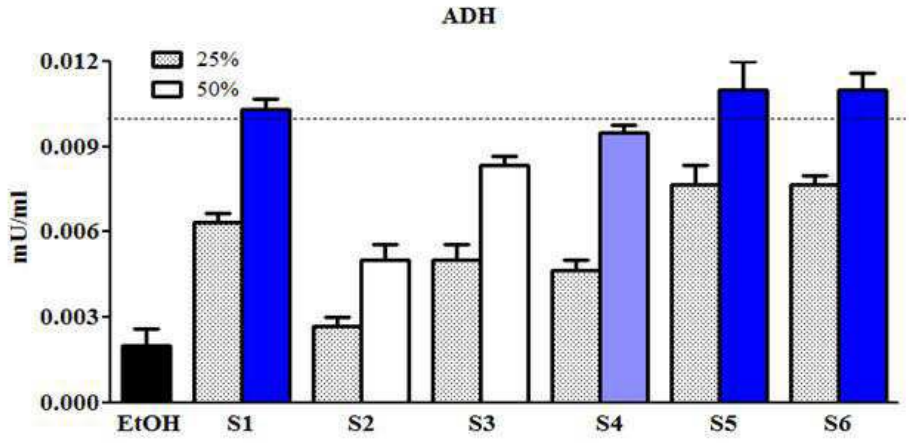
도면5


MTT
25%
50%
Cell viability (% of CTL)
150
100
50
0
CTL EtOH S1 S2 S3 S4 S5 S6

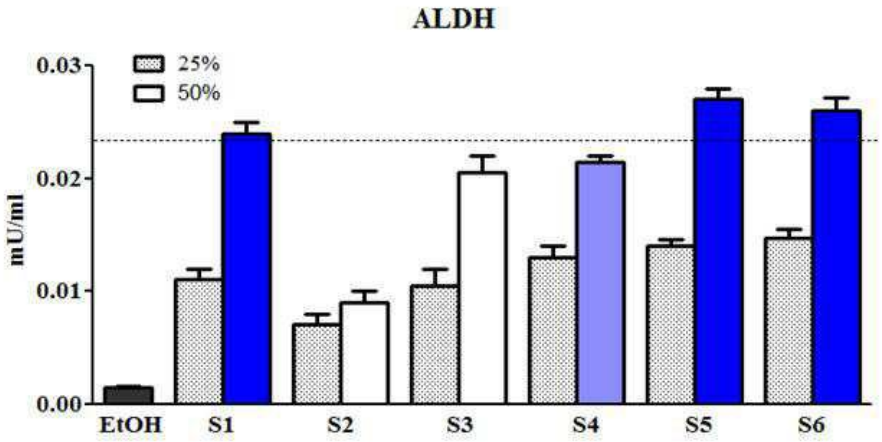
도면6


EtOH
PCTL
S1 150μl/kg
S2 150μl/kg
S3 150μl/kg
S4 150μl/kg
S5 150μl/kg
S6 150μl/kg
Blood EtOH Content (mM)
Time (hr)
0
5
10
15
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8

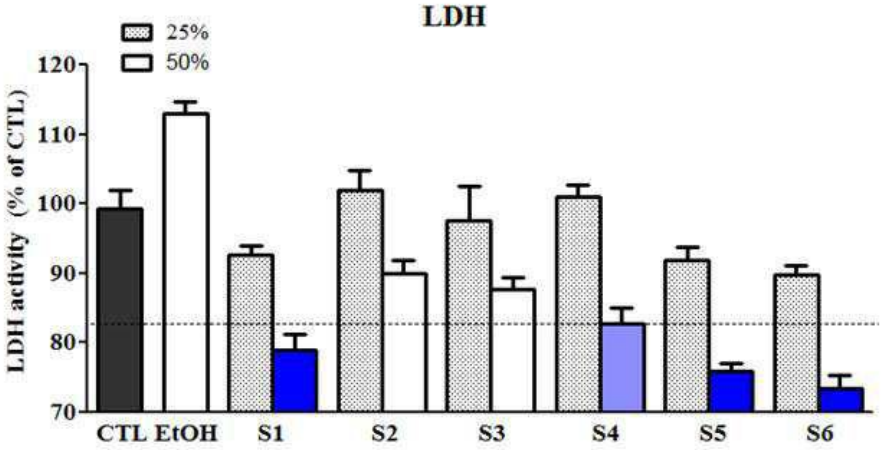
도면7


ADH
25%
50%
mU/ml
0.000
0.003
0.006
0.009
0.012
EtOH
S1
S2
S3
S4
S5
S6

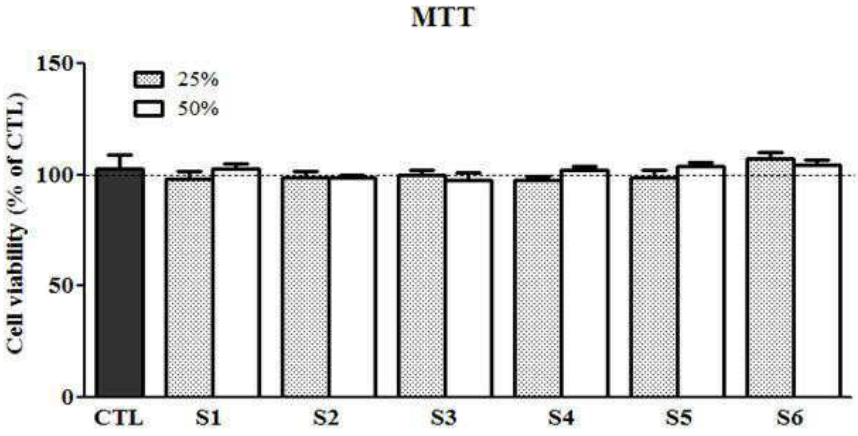
도면8


ALDH
25%
50%
mU/ml
0.03
0.02
0.01
0.00
EtOH
S1
S2
S3
S4
S5
S6

도면9


LDH
25%
50%
LDH activity (% of CTL)
120
110
100
90
80
70
CTL
EtOH
S1
S2
S3
S4
S5
S6

도면10


MTT
25%
50%
Cell viability (% of CTL)
150
100
50
0
CTL
S1
S2
S3
S4
S5
S6