



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월25일  
(11) 등록번호 10-2378839  
(24) 등록일자 2022년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/258 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)  
A61P 1/16 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 36/258 (2013.01)  
A61K 31/704 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0172106  
(22) 출원일자 2019년12월20일  
심사청구일자 2019년12월20일  
(65) 공개번호 10-2021-0079885  
(43) 공개일자 2021년06월30일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020100124609 A\*  
KR1020160122868 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
재단법인 금산인삼약초산업진흥원  
충청남도 금산군 금산읍 인삼광장로 25  
(72) 발명자  
김진성  
충남 금산군 금산읍 인삼광장로 25  
조운호  
대전광역시 대덕구 송촌로 7, 401호 (송촌동, 신  
미주택)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 2 항

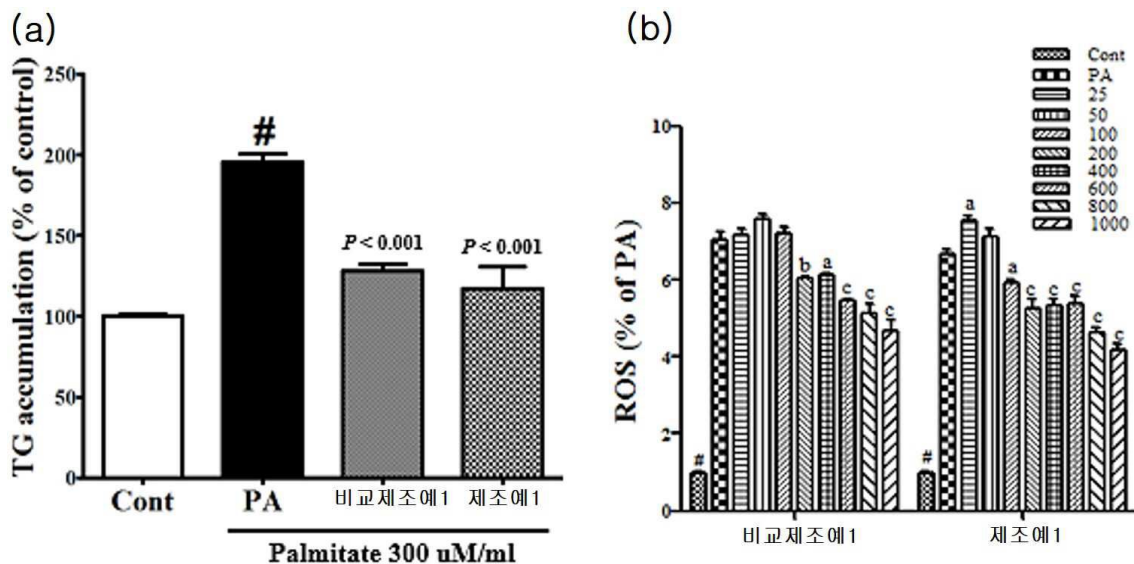
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 제조시간이 짧으면서도 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 가능하고, 세포독성이 현저히 낮은 동시에 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 효과를 나타내는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61P 1/16** (2018.01)

(72) 발명자

**김세정**

서울특별시 강동구 성안로 170, 103동 904호

**조상원**

충청남도 금산군 금산읍 인삼광장로 25

**유대석**

세종특별자치시 대평로 34, 409동 305호 (대평동,  
해들마을4단지)

**표미경**

충청남도 금산군 금산읍 비단로 332, 102-1504 (금  
산 한진타운 아파트)

**차선우**

경기도 수원시 권선구 호매실로165번길 71 (호매실  
동, 호매실 금호어울림 에듀포레)

**김영수**

충남 금산군 금산읍 인삼광장로 25

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

(1) 수삼을 90~100℃에서 4~6시간 동안 증숙하는 단계 및 증숙된 수삼을 55~65℃에서 7~9시간 동안 건조시키는 단계를 1세트로 하여 4~6세트 반복수행하여 흑삼을 제조하는 단계; 및

(2) 상기 흑삼 및 농도 60%~80%의 에탄올을 1:7~13의 중량비로 혼합한 혼합액을 추출 및 농축하여 흑삼 추출물을 제조하는 단계;를 포함하되,

상기 (1) 단계 전에, 60℃ 이상의 온도로 2시간 이상 건조하는 단계를 포함하지 않는

흑삼 추출물을 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제조방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 (2) 단계는,

(2)-1 상기 혼합액을 60~80℃에서 20~28시간 동안 2~4회 반복 추출하는 단계; 및

(2)-2 추출한 흑삼을 감압농축한 흑삼 추출물을 제조하는 단계;를 포함하는 흑삼 추출물을 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제조방법.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 제조시간이 짧으면서도 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 가능하고, 세포독성이 현저히 낮은 동시에 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 효과를 나타내는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 지방간에서 축적된 지방의 대부분은 중성지방(triglyceride)이며, 지방간은 크게 과음으로 인한 알콜성 지방간

질환(alcoholic fatty liver disease)과 비만, 당뇨병, 고지혈증, 약물 등으로 인한 비알콜성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)으로 나눌 수 있다.

- [0003] 알콜성 지방간 질환은 초기의 단순성 지방간에서 지방간염, 간경변으로 진행된다. 비알콜성 지방간 질환은 단순성 지방간에 머물며 병태가 진행되지 않는 것으로 알려져 있었지만, 근래 들어 비알콜성 지방간 질환도 단순성 지방간에서 지방간염이나 간경변으로 병태가 진행되는 경우가 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0004] 최근 영양상태가 좋아지고 성인병이 늘어감에 따라 지방간 환자가 늘어나는 추세에 있다. 대한간학회에 따르면 최근 10년간 간질환 유병율은 감소하였으나, 지방간 유병율은 20년간 3배나 증가하였으며, 그 중에서도 비알콜성 지방간의 비율이 50%를 초과하여 비알콜성 지방간 비율이 급격히 증가하고 있는 것으로 나타났다.
- [0005] 비알콜성 지방간 질환이란 간에 유해할 정도로 인정되는 알콜 섭취 병력이 없음에도 불구하고 간 조직 검사에서 알콜성 간염의 특징적인 소견인 지방성 변화(fatty change, steatosis)와 소엽성간염(lobular hepatitis, steatohepatitis) 등을 나타내는 경우를 말한다. 간의 병리소견은 단순 지방간(non-alcoholic fatty liver, NAFL)에서부터 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 지방간염과 동반된 섬유화증, 간경변증 등의 다양한 스펙트럼을 나타내는데, 비알콜성 지방간 질환은 이 모두를 포함하는 의미로 사용된다. 이러한 비알콜성 지방간 질환은 대부분 인슐린 저항성, 비만, 당뇨병, 고지혈증 등의 합병증을 동반한다. 이러한 합병증이 존재하는 경우에는 치료를 실시해야 하는데, 비알콜성 지방간 질환에 대한 치료의 원칙은 식사요법이나 운동요법 등 생활 습관의 개선이지만, 확실하게 실행하기 어려운 것이 현실이다. 특히, 비알콜성 지방간염의 경우 간경변 또는 간세포암으로 진전될 가능성이 높기 때문에 보다 적극적인 약물 치료가 필요하다.
- [0006] 한편, 종래의 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물은 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 불가하고, 세포독성이 높거나, 목적하는 수준으로 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능을 발현할 수 없는 문제가 있었다.
- [0007] 이에, 제조시간이 짧으면서도 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 가능하고, 세포독성이 현저히 낮은 동시에 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 효과를 나타내는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대한 연구가 시급한 실정이다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0008] (특허문헌 0001) KR 10-1998-0063566 A (공개일: 1998.10.07.)

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 제조시간이 짧으면서도 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 가능하고, 세포독성이 현저히 낮은 동시에 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 효과를 나타내는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 목적이 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 상술한 과제를 해결하기 위해 본 발명은, (1) 수삼을 85 ~ 105℃에서 3 ~ 7시간 동안 증숙하는 단계; 및 증숙된 수삼을 50 ~ 70℃에서 6 ~ 10시간 동안 건조시키는 단계를 1세트로 하여 3 ~ 7세트 반복수행하여 흑삼을 제조하는 단계; 및 (2) 상기 흑삼을 추출 및 농축하여 흑삼 추출물을 제조하는 단계;를 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물 제조방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 (2) 단계는, (2)-1 흑삼 및 유기용매를 포함하는 혼합액을 60 ~ 80℃에서 20 ~ 28시간 동안 2 ~ 4회 반복 추출하는 단계; 및 (2)-2 추출한 흑삼을 감압농축하여 흑삼 추출물을 제조하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0012] 또한, 상기 유기용매는 농도 60% ~ 80%의 에탄올일 수 있고, (2)-1 단계의 혼합액은 흑삼 및 유기용매를 1 : 7 ~ 13의 중량비로 포함할 수 있다.

- [0013] 또한, 상기 (1) 단계 전에, 60℃ 이상의 온도로 2시간 이상 건조하는 단계를 포함하지 않을 수 있다.
- [0015] 한편, 본 발명은 상술한 제조방법으로 제조되는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 흑삼 추출물은 진세노사이드(Ginsenoside) Rh4, 진세노사이드(Ginsenoside) Rk1 및 진세노사이드(Ginsenoside) Rg5를 총 15.5~23.5mg/g 을 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 흑삼 추출물은 총 페놀 함량이 650 mg/100g 이상일 수 있다.
- [0019] 한편, 본 발명은 상술한 흑삼 추출물을 유효성분으로 포함하되, 상기 흑삼 추출물을 농도 70 ~ 950 mg/kg로 포함하고, AMPK 및 PPAR- $\alpha$ 의 활성 증진을 통해 비알콜성 지방간 예방 또는 치료 효능을 발현하는 것을 특징으로 하는, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0020] 본 발명의 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물은 제조시간이 짧으면서도 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 가능하고, 세포독성이 현저히 낮은 동시에 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 효과가 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0021] 도 1은 본 발명에 의한 흑삼 추출물의 간세포 내 중성지방 축적 및 활성산소 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명에 의한 흑삼 추출물의 간세포 내 지방생성인자 측정결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명에 의한 흑삼 추출물의 제2형 당뇨 동물모델 간조직 내 과산화지질 지표 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명에 의한 흑삼 추출물의 제2형 당뇨 동물모델 간조직 내 지질생성인자 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명에 의한 흑삼 추출물의 제2형 당뇨 동물모델 간조직 내 지질생성과 산화활성 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명에 의한 흑삼 추출물의 제2형 당뇨 동물모델 간조직 내 항산화 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0022] 이하 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 따른 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물 제조방법은, (1) 수삼을 85 ~ 105℃에서 증숙 및 50 ~ 70℃에서 건조시키는 것을 1세트로 하여 3 ~ 7세트 반복수행하여 흑삼을 제조하는 단계; 및 (2) 상기 흑삼을 추출 및 농축하여 흑삼 추출물을 제조하는 단계;를 포함한다.
- [0026] 먼저, 흑삼을 제조하는 (1) 단계;에 대하여 설명한다.
- [0027] 상기 (1) 단계에서, 상기 증숙은 수삼을 85 ~ 105℃에서 3 ~ 7시간 동안, 바람직하게는 90 ~ 100℃에서 4 ~ 6시간 동안 증숙시킬 수 있다. 만일 상기 증숙의 온도 조건 및 시간 조건을 만족하지 못하면, 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 불가하고, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 저하될 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 (1) 단계에서, 상기 건조는 증숙한 수삼을 50 ~ 70℃에서 6 ~ 10시간 동안, 바람직하게는 증숙한 수삼을 55 ~ 65℃에서 7 ~ 9시간 동안 건조할 수 있다. 만일 상기 건조의 온도 조건 및 시간 조건을 만족하지 못하면, 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 불가하고, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 저하될 수 있다.
- [0029] 그리고, 상기 (1) 단계는, 상기 증숙 및 건조를 1세트로 하여 총 3 ~ 7세트, 바람직하게는 총 4 ~ 6세트 반복수행할 수 있다. 만일 상기 (1) 단계의 세트가 상기 범위를 벗어나면 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 불가하고, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 저하될 수 있다.
- [0030] 한편 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (1) 단계 전에 수삼을 세척 및 건조하는 단계를 더 포함할 수 있다.

상기 세척 및 건조하는 단계는 당업계에서 통상적으로 사용될 수 있는 방법에 의해 세척 및 건조를 수행할 수 있음에 따라, 본 발명에서는 이를 특별히 한정하지 않는다.

- [0031] 한편, 본 발명에 따른 흑삼 추출물 제조방법은 상기 (1) 단계 전에, 60℃ 이상의 온도로 2시간 이상 건조하는 단계를 포함하지 않을 수 있고, 바람직하게는 상기 (1) 단계 전에, 70℃ 이상의 온도로 2.5시간 이상 건조하는 단계를 포함하지 않을 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 (1) 단계 전에, 80℃ 이상의 온도로 3시간 이상 건조하는 단계를 포함하지 않을 수 있다. 상기 (1) 단계 전에, 60℃ 이상의 온도로 2시간 이상 건조하는 단계를 포함하지 않음에 따라 제조시간이 짧으면서도 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 가능하고, 세포독성이 없는 동시에 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 효과를 발현할 수 있다.
- [0033] 다음으로, 흑삼을 추출 및 농축하여 흑삼 추출물을 제조하는 (2) 단계를 설명한다.
- [0034] 상기 (2) 단계는, (2)-1 흑삼 및 유기용매를 포함하는 혼합액을 반복추출하는 단계; 및 (2)-2 추출한 흑삼을 감압농축하여 흑삼 추출물을 제조하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 (2)-1 단계는 흑삼 및 유기용매를 포함하는 혼합액을 반복추출하는 단계로써, 상기 혼합액을 60 ~ 80℃에서 20 ~ 28시간 동안 2 ~ 4회 반복추출할 수 있고, 바람직하게는 혼합액을 65 ~ 75℃에서 22 ~ 26시간 동안 3 ~ 4회 반복추출할 수 있다. 만일 상기 반복추출의 온도, 시간 및/또는 반복횟수를 만족하지 못하면 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 불가하고, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 저하될 수 있다.
- [0036] 한편, 상기 유기용매는 통상적으로 추출용매로 사용될 수 있는 물질이라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 발효에탄올 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유기용매를 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있다. 상기 유기용매로 에탄올을 사용하는 경우 상기 유기용매는 농도 60 ~ 80%의 에탄올일 수 있고, 바람직하게는 농도 65 ~ 75%의 에탄올일 수 있으며, 보다 바람직하게는 농도 67 ~ 73%의 에탄올 일 수 있다. 만일 상기 에탄올의 농도가 상기 범위를 벗어나면 추출되는 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 불가하고, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 저하될 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 혼합액은 상기 흑삼 및 유기용매를 1 : 7 ~ 13의 중량비로, 바람직하게는 1 : 8 ~ 12의 중량비로 포함할 수 있다. 만일 상기 흑삼 및 유기용매의 중량비가 상기 범위를 벗어나면 추출되는 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 불가하고, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 저하될 수 있다.
- [0038] 그리고, 상기 (2)-2 단계는 흑삼을 감압농축하여 흑삼 추출물을 제조하는 단계로써, 상기 감압농축의 조건은 통상적으로 사용할 수 있는 감압농축의 조건이라면 제한 없이 사용할 수 있음에 따라, 본 발명에서는 이를 특별히 한정하지 않는다.
- [0039] 또한, 상기 (2)-1 단계와 (2)-2 단계 사이어 추출한 흑삼을 여과시키는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 감압농축 후 동결건조 및/또는 진공감압건조를 더 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 한편, 본 발명은 상술한 제조방법으로 제조되는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물을 제공한다.
- [0042] 상기 흑삼 추출물은 상술한 제조방법을 통해 제조됨에 따라 진세노사이드(Ginsenoside) Rh4, 진세노사이드(Ginsenoside) Rk1 및 진세노사이드(Ginsenoside) Rg5를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 진세노사이드(Ginsenoside) Rh4, 진세노사이드(Ginsenoside) Rk1 및 진세노사이드(Ginsenoside) Rg5를 총 15.5~23.5mg/g 포함할 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 흑삼 추출물은 총 페놀 함량이 650 mg/100g 이상일 수 있고, 바람직하게는 670 mg/100g 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 680 mg/100g 이상일 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명은 상술한 흑삼 추출물을 유효성분으로 포함하되, 상기 흑삼 추출물을 농도 70 ~ 950mg/kg로, 바람직하게는 100 ~ 900mg/kg로 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0046] 상기 흑삼 추출물을 상기 농도로 포함함에 따라 세포독성이 없는 동시에 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 효과를 발현할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 흑삼 추출물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물은 제조시간이 짧으면서도 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 고수득이 가능하고, 세포독성이 현저히 낮은 동시에 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 효과가 있다.



[0050] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하지만, 하기 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0051] [실시예]

[0052] 실시예 1: 흑삼추출물의 제조

[0053] (1) 흑삼의 제조

[0054] 5년생의 수삼을 95℃에서 5시간 동안 증숙 및 60℃에서 8시간 동안 건조시키는 것을 1세트로 하여 5세트 반복수행하여 흑삼을 제조하였다.

[0055] (2) 흑삼 추출물의 제조

[0056] 상기 제조한 흑삼을 농도 70%의 에탄올과 1 : 10의 중량비로 혼합한 혼합액을 70℃에서 24시간 동안 3회 반복추출하고, 여과시킨 후, 감압농축 및 동결건조를 수행하여 흑삼 추출물을 제조하였다.

[0058] 실시예 2: 흑삼추출물의 제조

[0059] (1) 흑삼의 제조

[0060] 5년생의 수삼을 90℃에서 4시간 동안 1차 건조시켰다. 그리고 96℃에서 4시간 동안 증숙 및 56℃에서 36시간 동안 건조시키는 것을 1세트로 하여 5세트 반복수행하여 흑삼을 제조하였다.

[0061] (2) 흑삼 추출물의 제조

[0062] 상기 제조한 흑삼을 농도 70%의 에탄올과 1 : 10의 중량비로 혼합한 혼합액을 70℃에서 24시간 동안 2회 반복추출하고, 여과시킨 후, 감압농축 및 동결건조를 수행하여 흑삼 추출물을 제조하였다.

[0064] <실험예 1>

[0065] 상기 실시예에 따라 제조된 흑삼 추출물에 대하여 하기 항목에 대하여 측정/평가하여 하기 표 1에 나타내었다.

[0066] 1. 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 정량분석

[0067] 상기 실시예에 따라 제조한 흑삼 추출물에 대하여, HPLC 그로마토그램을 통해 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 양을 정량분석 하였다.

[0068] 2. 총 페놀 함량 측정

[0069] 상기 실시예에 따라 제조한 흑삼 추출물에 대하여, 총 폴리페놀의 함량 측정은 시료 무게 대비 10배의 증류수를 가하여 진탕 혼합한 후 여과한 여액 1 mL에 Foline-Ciocalteu 시약 0.5 mL를 넣고 3분 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5 mL씩을 가한 후 혼합하여 실온의 암실에서 1시간 정지한 다음 분광광도계로 760 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로 gallic acid (Sigma Chemical Co.,)를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량선으로부터 총 페놀화합물의 함량을 계산하여 산출하였다.

표 1

구분	실시예1	실시예2
진세노사이드 Rh4(mg/g)	7.78	5.75
진세노사이드 Rk1(mg/g)	5.16	2.63
진세노사이드 Rg5(mg/g)	8.28	3.16
Rh4, Rk1 및 Rg5의 총량(mg/g)	21.22	11.54
총 페놀 함량(mg/100g)	701.35±4.16	640.56±1.39

[0071] 표 1에서 알 수 있듯이, 본 발명에 따른 증숙 및 건조 조건을 모두 만족하면서 1차 열처리를 포함하지 않는 실시예 1이, 1차 열처리를 포함하고 본 발명에 다른 증숙 및/또는 건조 조건을 만족하지 못하는 실시예 2에 비하여 수득되는 진세노사이드 Rh4, Rk1 및 Rg5의 양이 현격히 많으며, 총 페놀 함량이 현격히 높은 것을 확인할 수 있다.

[0073] 제조예 1: 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물의 제조

- [0074] 상기 실시예 1에 따른 흑삼추출물을 포함하는 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물을 제조하였다.
- [0076] **비교예 1**
- [0077] **(1) 홍삼의 제조**
- [0078] 국내 유통되고 있는 6년근 홍삼을 구매하여 사용하였다.
- [0079] **(2) 홍삼 추출물의 제조**
- [0080] 상기 제조한 홍삼을 농도 70%의 에탄올과 1 : 10의 중량비로 혼합한 혼합액을 70℃에서 24시간 동안 3회 반복추출하고, 여과시킨 후, 감압농축 및 동결건조를 수행하여 홍삼 추출물을 제조하였다.
- [0082] **비교제조예 1**
- [0083] 상기 제조예 1과 동일하게 실시하여 제조하되, 상기 실시예 1에 따른 흑삼추출물을, 상기 비교예 1에 따른 홍삼추출물로 변경하여 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물을 제조하였다.
- [0085] **<실험예 2>**
- [0086] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여 하기 항목을 측정/평가하여 도 1에 나타내었다.
- [0087] **1. 중성지방(triglyceride, TG) 축적율 측정**
- [0088] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 간세포(HepG2)를 6-well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well 밀도로 분주하고 300  $\mu$ M palmitate와 2% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 DMEM으로 24시간 배양하여 지방증(steatosis)을 유도하였다. 실험군에서는 각 추출물 500  $\mu$ g/ml 농도로 함께 처리하였다. 지방증이 유도된 세포를 2% formalin으로 고정하였으며, 60% isopropanol과 증류수로 세척하는 과정을 거친 뒤 상온에서 plate를 완전히 건조한 뒤 60% isopropanol에 용해시킨 Oil Red O dye를 처리하였다. 10분 동안 shaker에 넣고 incubation 이후 증류수로 세척하였고, 염색 정도를 현미경으로 관찰하고 지방 함유량을 측정하기 위해 염색된 plate에 100% isopropanol로 용해하고 Multi-mode microplate reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 정량화하였다. 중성지방(triglyceride, TG) 축적율을 측정하여 도 1a에 나타내었다.
- [0089] 그 결과, 도 1a에 도시된 바와 같이 제조예 1은 비교제조예 1에 비하여 중성지방(triglyceride, TG) 축적율이 현저히 낮음에 따라, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 것을 확인할 수 있다.
- [0090] **2. 활성산소(ROS) 평가**
- [0091] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 각 추출물의 직접적인 Reactive oxygen species(ROS) 소거능을 확인하기 위하여 DCF-DA를 사용하여 측정하였다. 96-well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well 밀도로 분주한 뒤 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 각 추출물을 0, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000  $\mu$ g/ml로 처리하고, 대조군은 palmitate 300  $\mu$ M를 처리한 후 24시간 배양하였다. 최종 농도 10  $\mu$ M DCF-DA를 처리하고 40분 뒤에 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고 1시간 배양하였다. Multi-mode microplate reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 485 nm에서 흡광도를 측정하였고, 참고파장은 530 nm으로 하였다. 이를 통해 활성산소(ROS) 발생비율을 측정하여 도 1b에 나타내었다.
- [0092] 그 결과, 도 1b에 도시된 바와 같이 제조예 1은 비교제조예 1에 비하여 활성산소(ROS) 발생비율이 현저히 낮음에 따라, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 것을 확인할 수 있다.
- [0093] 특히, 제조예 1의 흑삼 추출물 농도 70 ~ 950 $\mu$ g/ml 범위에서 활성산소 발생비율이, 동일 농도에서 비교제조예 1에 비하여 현저히 낮음에 따라, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 것을 확인할 수 있다.
- [0095] **<실험예 3>**
- [0096] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여 하기 항목을 측정/평가하여 도 2에 나타내었다.
- [0097] 각 추출물 처리에 따른 간세포 내 지방생성 및 축적 저해 효능을 확인하기 위하여 pAMPK, SREBP-1c 단백질



질 발현을 측정하였다. 6-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well 밀도로 분주하고 300  $\mu$ M palmitate와 2% bovine serum albumin을 함유한 DMEM으로 24시간 배양하고, 실험군은 각 추출물 500  $\mu$ g/ml 농도로 함께 처리하였다. 상기 세포들은 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin 및 1 mM PMSF를 포함하는 PRO-PREP protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Kyungki-do, Korea)로 용해하였다. 총 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동을 전개하고 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer하였다. 5% skim milk가 첨가된 Tris-buffered saline (TBS)로 상온에서 blocking하였다. 각각의 specific primary antibody를 TBS로 용해하여 4°C에서 overnight 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 2차 항체와 반응시켰다. ChemiDoc XRS™ with image Lab software (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질 발현 여부를 분석하였다.

[0098] **1. AMPK 활성 평가**

[0099] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 500 $\mu$ g/ml에서 통해 AMPK 활성을 평가하여 도 2a에 나타내었다.

[0100] **2. SREBP1c(sterol regulatory element-binding protein 1c) 억제 평가**

[0101] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 500 $\mu$ g/ml에서 SREBP1c(sterol regulatory element-binding protein 1c) 억제를 평가하여 도 2b에 나타내었다.

[0102] **3. FAS(fatty acid synthase) 억제 평가**

[0103] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 500 $\mu$ g/ml에서 FAS(fatty acid synthase) 억제를 평가하여 도 2c에 나타내었다.

[0104] 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이 제조예 1은 비교제조예 1에 비하여 AMPK 활성 증가에 따라 지방생성인자인 SREBP1c, FAS가 현저히 억제됨에 따라, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0106] **<실험예 4>**

[0107] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 하기 항목을 측정/평가하였다.

[0108] 각 추출물 처리에 따른 비알콜성지방간이 형성된 제2형당뇨 동물 모델 C57BL/KsJ db/db mice (6주령, 수컷 20-27g)는 라온바이오 (Korea)에서 구입하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 실험은 1주간 적응기간을 거친 후 실시하였다. 순화된 마우스를 8마리씩 7군으로 나누고 rosiglitazone (0.5 mg/kg), 홍삼과 흑삼 추출물은 저농도 (100 mg/kg), 고농도 (900 mg/kg)으로 나누어 6주간 경구 투여를 실시하였고, 간 조직을 적출하여 생리식염수로 세척 한 후 균질화하여 실험에 사용하였다.

[0109] SREBP-1c, pAMPK, ACC, FAS, C/EBP- $\alpha$ , PPAR- $\alpha$  그리고 HO-1 단백질 발현을 측정하였다

[0110] 간조직 내 지방생성 및 축적 저해 효능을 확인하기 위하여 SREBP-1c, pAMPK와 FAS 단백질 발현을 측정하였다. 상기 간조직들은 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin 및 1 mM PMSF를 포함하는 PRO-PREP protein extraction solution (iNtRON Biotechnology, Kyungki-do, Korea)로 용해하였다. 총 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동을 전개하고 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer하였다. 5% skim milk가 첨가된 Tris-buffered saline (TBS)로 상온에서 blocking하였다. 각각의 specific primary antibody를 TBS로 용해하여 4°C에서 overnight 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 2차 항체와 반응시켰다. ChemiDoc XRS™ with image Lab software (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질 발현 여부를 분석하였다.

[0111] **1. MDA(malondialdehyde) 형성 평가**

[0112] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 100mg/kg, 900mg/kg에서 지질과산화 형성 평가를 위해 MDA의 측정은

thiobarbituric acid를 사용하는 Ohkawa등의 방법을 사용하였다. 먼저 상기 방법으로 얻은 간조직 1 g에 1.15% KCl을 9 ml의 비율로 혼합 후에 4℃에서 균질화 시켰다. 균질화된 조직액 0.1 ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2 ml, NaOH로 pH를 3.5에 맞춘 20% acetic acid 1.5ml, 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 1.5 ml를 혼합하고 증류수 더하여 4 ml로 만든 후에 95℃의 물에서 30분에서 1시간 동안 반응시킨 후 실온에서 냉각시켰다. 이후 증류수 1 ml와 흡광도를 높이기 위하여 n-butanol 과 pyridine을 15 : 1의 비율의 혼합액 5 ml를 섞어 1~2분간 흔들어 준 뒤에 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액 1~2 ml를 취하여 Multi-mode microplate reader (Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 485 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 통해 MDA(malondialdehyde) 형성을 평가하여 도 3에 나타내었다

[0113] 그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이 제조예 1은 비교제조예 1에 비하여 MDA 형성이 현격히 저하됨에 따라, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0114] **2. AMPK 활성 평가**

[0115] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 100mg/kg, 900mg/kg에서 AMPK 활성을 평가하여 도 4a에 나타내었다.

[0116] **3. SREBP1c(sterol regulatory element-binding protein 1c) 억제 평가**

[0117] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 100mg/kg, 900mg/kg에서 SREBP1c(sterol regulatory element-binding protein 1c) 억제를 평가하여 도 4b에 나타내었다.

[0118] **4. ACC(acety-CoA carboxylase) 억제 평가**

[0119] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 100mg/kg, 900mg/kg에서 ACC(acety-CoA carboxylase) 억제를 평가하여 도 4c에 나타내었다.

[0120] **5. FAS(fatty acid synthase) 억제 평가**

[0121] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 100mg/kg, 900mg/kg에서 FAS(fatty acid synthase) 억제를 평가하여 도 4d에 나타내었다.

[0122] 그 결과, 도 4에 도시된 바와 같이 제조예 1은 비교제조예 1에 비하여 AMPK 활성 증가에 따라 지방생성인자인 SREBP1c, ACC, FAS가 현저히 억제됨에 따라, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0124] **<실험예 5>**

[0125] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 하기 항목을 측정/평가하였다.

[0126] **1. C/EBP- $\alpha$  발현 억제 평가**

[0127] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 100mg/kg, 900mg/kg에서 C/EBP- $\alpha$  발현 억제를 평가하여 도 5a에 나타내었다.

[0128] **2. PPAR- $\alpha$  활성 평가**

[0129] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도 PPAR- $\alpha$  활성을 평가하여 도 5b에 나타내었다.

[0130] 그 결과, 도 5에 도시된 바와 같이 제조예 1은 비교제조예 1에 비하여 지방생성인자인 C/EBP- $\alpha$  발현이 억제되고, PPAR- $\alpha$  활성이 현격히 증가됨에 따라, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0132] **<실험예 6: HO-1(Heme oxygenase-1) 발현 평가>**

[0133] 상기 제조예 1 및 비교제조예 1에 따라 제조한 비알콜성 지방간 예방 또는 치료용 조성물에 대하여, 흑삼 추출물과 홍삼 추출물 각각 농도100mg/kg, 900mg/kg에서 HO-1(Heme oxygenase-1) 발현을 평가하여 도 6에 나타내었

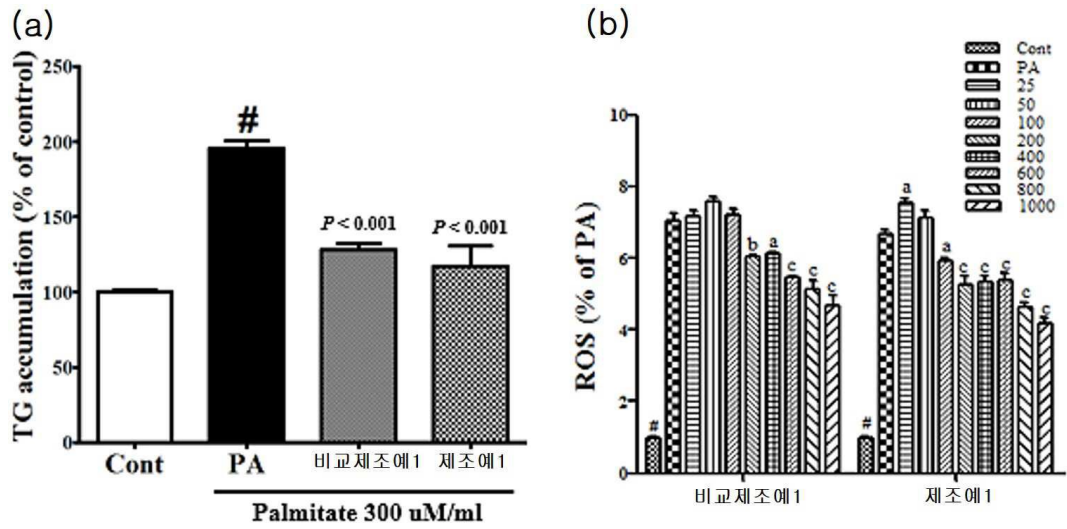
다.

[0134] 그 결과, 도 6에 도시된 바와 같이 제조예 1은 비교제조예 1에 비하여 간 조직 내 항산화 효소 증가에 따라, 비알콜성 지방간 예방 또는 치료효능이 월등히 우수한 것을 확인할 수 있다.

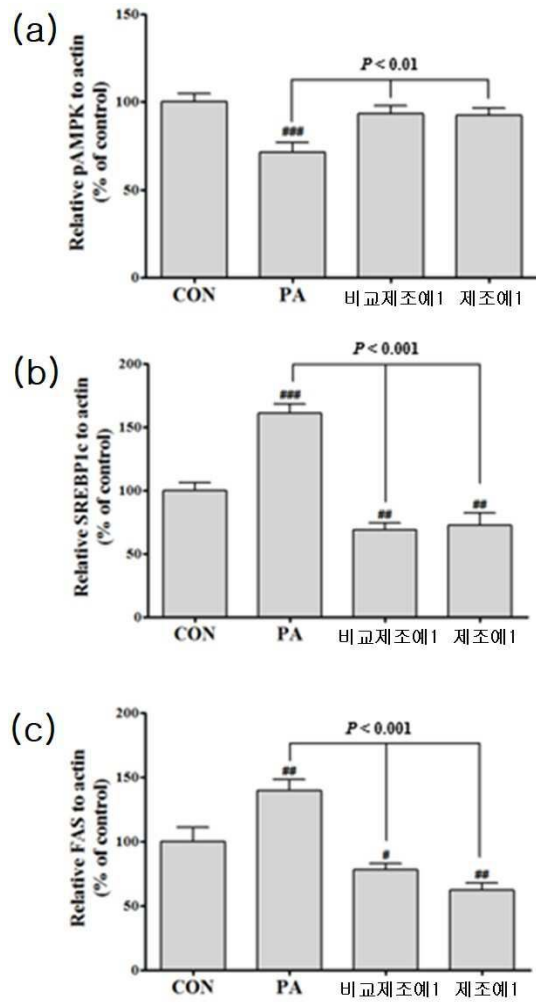
[0136] 이상에서 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 본 발명의 사상은 본 명세서에 제시되는 실시예에 제한되지 아니하며, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서, 구성요소의 부가, 변경, 삭제, 추가 등에 의해서 다른 실시 예를 용이하게 제안할 수 있을 것이나, 이 또한 본 발명의 사상범위 내에 든다고 할 것이다.

**도면**

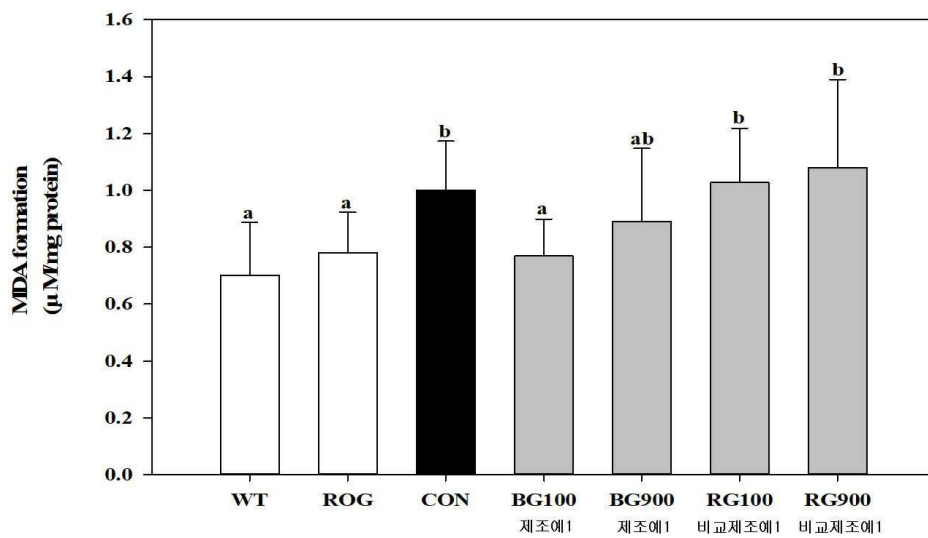
**도면1**



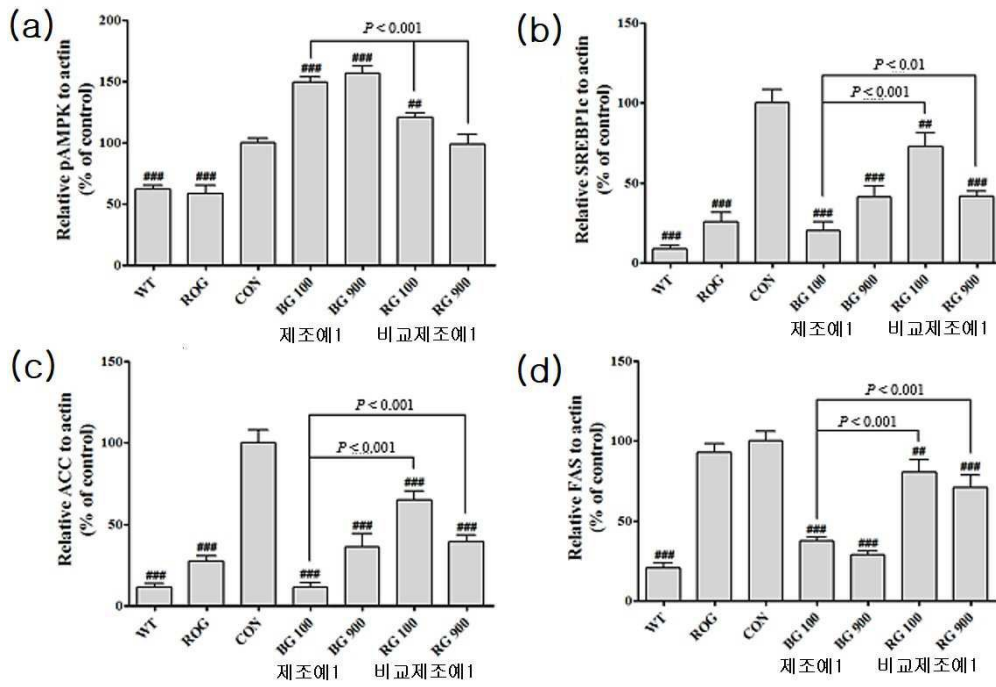
도면2



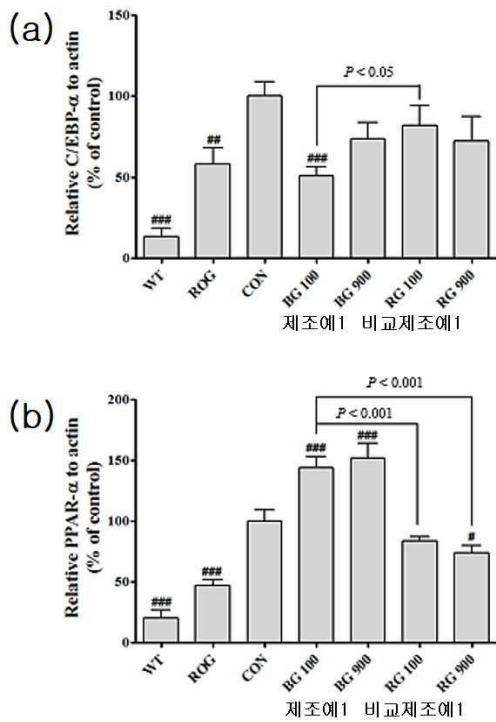
도면3



도면4



도면5



도면6

