



(72) 발명자

**오규철**

광주 남구 봉선로133번길 4, 7동 402호 (봉선동, 금호1차아파트)

**김선오**

광주 북구 양일로 52, 201동 1003호 (연제동, 연제2차대주피오레)

**나주련**

광주 남구 회서로22번가길 7-2, (주월동)

**한설희**

광주 남구 광복마을7길 24-9, (주월동)

**정명아**

광주 서구 화운로83번길 28-7, (화정동)

**홍지애**

전남 화순군 화순읍 오성로 558, 301동 1706호 (화순3차서라아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0001456

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 (재)호남권광역경제권선도산업지원단장

연구사업명 호남권 광역경제권 선도산업

연구과제명 틈새녹색자원을 이용한 항콜레스테롤 건강기능식품 개발

기여율 1/1

주관기관 한국인스팜주식회사

연구기간 2012.06.01 ~ 2015.04.30

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

울금 : 연잎 = 1~10 : 10~1의 중량비(w/w)로 배합된 울금 및 연잎 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 동맥경화증, 심부전증, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 선천성 심장질환, 심근경색증, 협심증, 뇌졸중 또는 말초혈관질환으로부터 선택된 동맥경화성 혈관계 질환의 치료 및 예방용 약학조성물.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매인 약학 조성물.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

울금 : 연잎 = 1~10 : 10~1의 중량비(w/w)로 배합된 울금 및 연잎 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 동맥경화증, 심부전증, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 선천성 심장질환, 심근경색증, 협심증, 뇌졸중 또는 말초혈관질환으로부터 선택된 동맥경화성 혈관계 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명의 울금 및 연잎 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 동맥경화성 혈관계 질환 또는 비만증의 개선 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] [문헌 1] World Health Organization Regional Office for the Western Pacific(WPRO), the International Association for the Study of Obesity(IASO) and the International Obesity Task Force(IOTF). The Asia-Pacific perspective-redefining obesity and its treatment. 2000.)

[0003] [문헌 2] World Health Organization Expert Consultation. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. Lancet. 2004;363:157-163

[0004] [문헌 3] Duntas LH., Tyroid, 12(4):287-293, 2002.

[0005] [문헌 4] Fujioka K et al., Diabetes Obes. Metab., 2(3), pp175-187,2000; Leung WYS et al., Clinical Therapeutics, 25(1), pp58-80, 2003; McMahon FG et al., Arch. Int. Med., 160(14), pp2185-2191, 2000.

[0006] [문헌 5] 김창민, 신민교 외, 정담 도서출판, 중약대사전, 7권, pp3282-3287, 1997

[0007] [문헌 6] 정보섭 외, 도해향약대사전, 영림사, p514-517, 1998)[문헌 3] 정보섭외, 도해향약대사전, 영림사, p798-799, 1998

- [0008] [문헌 7] Carmichael J, et al., 3805.Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing., *Cancer Res.* 1987 Feb 15;47(4):936-42
- [0009] [문헌 8] Phillips M et al., Inhibition of 3T3-L1 adipose differentiation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *J Cell Sci.* 1995 Jan;108 ( Pt 1):395-402
- [0010] [문헌 9] Ting-Tsz Ou et al., Mulberry extract inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance, *J Sci Food Agric* 2011; 91: 27402748
- [0011] [문헌 10] Hiroshi Hirata et al., Xanthohumol Prevents Atherosclerosis by Reducing Arterial Cholesterol Content via CETP and Apolipoprotein E in CETP-Transgenic Mice, *PLoS One.* 2012; 7(11): e49415).

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0012] 비만은 정신 및 사회적 요인, 유전, 질병, 약물 등의 다양한 원인으로 에너지 섭취가 소비보다 증가할 때 발생된다. 최근 식생활의 변화와 신체 활동량의 감소로 비만이 증가하고 있으며, 이와 관련된 고혈압, 심혈관질환, 당뇨병 등의 만성질환이 증가하는 추세이다[1]. 세계보건기구(WHO)는 1996년 비만을 단순히 몸매가 좋지 않거나 배가 나온 체형의 문제가 아니라, 고혈압, 당뇨병, 동맥경화성 혈관계 질환과 같은 질병에 걸릴 위험을 증가시키고 나아가 사망률을 증가시키는 질병으로 규정하였다. (World Health Organization Regional Office for the Western Pacific(WPRO), the International Association for the Study of Obesity(IASO) and the International Obesity Task Force(IOTF). *The Asia-Pacific perspective-redefining obesity and its treatment.* 2000.)
- [0013] 비만의 종류에는 원인에 따라서, 단순 비만과 증후성 비만으로 분류할 수 있다. 단순 비만은 과식과 운동 부족이 그 원인이며, 증후성 비만은 내분비, 시상하부성, 유전, 전두엽 및 대사성 등으로 발생하는데 최근 우리나라에서는 식습관이 서구화됨에 따라 단순 비만자가 현저히 증가하고 있다. (*The Asia-Pacific Perspective : Redefining obesity and its treatment.* WHO Western Pacific Region. Korean ed, p1-10, 2000.)
- [0014] 앞서 기술한 바와 같이 비만은 단순히 체중 과다에 그치지 않고 당뇨병, 지방간, 고혈압, 동맥경화성 혈관계 질환, 심혈관질환 및 암 등과 같은 만성 퇴행성 질환의 위험요인이 된다는 점에서 중요한 관심의 대상이 되고 있다.
- [0015] Cholesterol ester transfer protein(CETP)은 cholesterol metabolism에서 중요한 역할을 하며 혈중에서 지단백질의 콜레스테롤 에스터와 중성지방을 교환하는 역할을 하는 당단백질이다. HDL의 혈중 농도를 조절하며 중성지방의 농도가 증가할수록 지방운송단백질인 CETP의 활성이 증가하는데 CETP 억제제는 지질대사를 조절하는 약물로 알려져 있다.(Duntas LH., *Tyroid*, 12(4):287-293, 2002.)
- [0016] 이러한 비만의 심각성이 더해지면서 비만의 예방 및 치료를 위한 물질과 제품에 대한 많은 연구와 개발이 이루어지고 있으나, 비만 치료에 있어서 항비만약물의 이용이 중요하지만 시중에 유통되고 있는 항비만약 물은 그 부작용이 문제가 되고 있는데 현재까지 약물치료에 쓰이는 많은 제품들이 부작용과 나아가 사회적으로도 많은 심각성을 나타내고 있음이 주지의 사실이다.
- [0017] 텍스펜플루라민(Dexfenfluramine)과 펜플루라민 (fenfluramine)은 세로토닌 (serotonin) 재흡수 억제제로 미국식품의약국 (FDA)에서 승인은 받았으나 심장판막의 이상이 발견되어 1997년 10월에 시장에서 제품이 회수되었고, 플루섹틴 (fluoxetine)은 알러지성 발진, 메스꺼움, 불면증 등의 부작용이 보고되었으며, 디에틸프로피온 (diethylpropion), 펜터민 (phentermine) 및 마진돌 (mazindol) 등에서도 불면증, 두통, 메스꺼움, 갈증 등의 부작용이 관찰되고 있다. 또한, 시부트라민 (sibutramine) 의 심혈관계에 부작용에 대한 보고와 최근 들어서 폭발적인 판매를 올리고 있는 비만치료제의 전문의약품인 제니칼(Xenical, orlistat)의 위장관계열 부작용 등이 그것이다. (Fujioka K et al., *Diabetes Obes. Metab.*, 2(3), pp175-187,2000; Leung WYS et al., *Clinical Therapeutics*, 25(1), pp58-80, 2003; McMahon FG et al., *Arch. Int. Med.*, 160(14), pp2185-2191, 2000.)
- [0018] 가장 최근에는 아레나사의 '벨비크'가 비만치료제로는 13년만에 FDA승인을 받았고, 바이부스사의 '큐넥사'가 승인을 기다리고 있지만 이 약물들 또한 많은 부작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 비만의

개선 및 예방을 위한 부작용이 없는 새로운 기능성 소재의 개발이 요구되고 있다.

[0019] 울금은 생강과의 식물인 울금 (*Curcuma Longa L.*)의 덩이뿌리를 그대로 또는 주피를 제거하고 썰서 말린 것을 말하며 일본에서는 뿌리줄기를 말한다. 중국에서는 울금 및 생강과의 동속식물인 광서아출 (*Curcuma kwangsiensis* SG Lee & CF Liang:廣西莪朮), 온옥금(*Curcuma wenyujin* YH Chen & C. Ling:溫郁金), 봉아출 (*Curcuma phaeocaulis* Valetton:蓬莪朮)의 뿌리줄기를 가을 울금이라고도 하는(*Curcuma longa* Linn)의 덩이뿌리를 말한다. 이는 강황 (*Curcuma longa* Linn)과 유사한 외형을 하고 있으나 잎의 양면이 모두 매끈한 특징을 갖는다. 중국 남부와 인도, 오키나와를 비롯한 동남아시아지역에서 자생, 재배되며 우리나라의 중남부지역에서도 재배된다. 술과 함께 섞으면 누렇게 금처럼 되어 붙여진 이름이며 모양이 아술(莪)과 비슷하고 말의 질병을 치료하므로 마술(馬)이라 하기도 하였다.(문헌 5: 김창민, 신민교 외, 정담 도서출판, 중약대사전, 7권, pp3282-3287, 1997)

[0020] 하엽(=연꽃)은 수련과(Nymphaeaceae) 연꽃(*Nelumbo nucifera*)의 잎을 지칭하며, 잎에는 로에메린(roemerine), 누시페린(nuciferine), 노르누시페린(nornuciferine), 아르메파빈(armepavine), 프로누시페린(pronuciferine), 리리오데닌(liriodenine), 등의 성분이 알려져 있으며, 변비, 부종, 각혈, 혈변 등의 치료에 사용되어 왔다. (문헌 6: 정보섭 외, 도해향약대사전, 영림사, p514-517, 1998)

[0021] 그러나, 상기 문헌의 어디에도 울금 및 연잎 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 항 콜레스테롤 효과 및 비만증 치료효과에 대하여 개시되거나 교시된 바가 없다.

[0022] 이에 본 발명자들은 한방제로 사용되고 있는 생약 추출물 가운데 안전성이 뛰어나고 항 콜레스테롤 효과 및 비만의 예방 및 치료 효과를 가진 원료를 찾고자 하는 노력을 계속해오는 가운데, 울금 및 연잎 조합 생약 추출물이 울금과 연잎을 개개 단독 처리한 것보다 보다 상승적인 지방억제 효과가 있으며 (실험예 2); in vitro 상에서보다 상승적인 총 콜레스테롤 억제 효과가 있고(실험예 3), 보다 상승적인 CETP 활성 저해 효과를 나타내며 (실험예 4), in vivo 상에서 보다 상승적인 총 콜레스테롤 억제 효과가 있음을 확인함으로써(실험예 5) 상승적으로 항 콜레스테롤 효과 및 비만의 예방 및 치료효과 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

**과제의 해결 수단**

[0023] 상기 목적을 해결하기 위해 본 발명은 울금 및 연잎 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 동맥경화성 혈관계 질환 또는 비만증의 치료 및 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은 울금 및 연잎 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 동맥경화성 혈관계 질환 또는 비만증의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0025] 본원에서 정의되는 상기 추출물은 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 10 내지 100% 주정, 보다 더 바람직하게는 50 내지 100% 주정에 가용한 추출물을 포함한다.

[0026] 본 발명의 복합 생약 추출물은 울금 : 연잎 = 1~10 : 10~1의 중량비(w/w), 바람직하게는 울금 : 연잎= 1~5 : 5~1의 중량비(w/w), 보다 바람직하게는 울금 : 연잎 = 1~3 : 3~1의 중량비(w/w)로 배합됨임을 특징으로 한다.

[0027] 본원에서 정의되는 동맥경화성 혈관계 질환은 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 동맥경화증, 심부전증, 고혈압성 심장질환, 부정맥, 선천성 심장질환, 심근경색증, 협심증, 뇌졸중 또는 말초혈관질환, 바람직하게는 고콜레스테롤혈증, 고지혈증 또는 동맥경화증을 포함한다.

[0028] 이하 본 발명의 울금 및 연잎 조합 추출물을 수득하는 방법을 보다 상세하게 설명한다.

[0029] 예를 들어, 본 발명의 울금 및 연잎 조합 추출물은 건조시킨 울금 및 연잎을 건조된 시료 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 5 내지 15배 분량의 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 10 내지 100% 주정, 보다 더 바람직하게는 50 내지 100% 주정을 가하여 1시간 내지 10시간, 바람직하게는 2시간 내지 6시간 동안 40℃ 내지 160℃, 바람직하게는 80℃ 내지 120℃에서 1 내지 10회, 바람직하게는 2 내지 5회 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출 등의 추출방법, 바람직하게는 열수추출법으로 추출한 후 동결건조하여 농축하는 단계를 통하여 수득된 울금 및 연잎 추출물을 일정한 배합비로 배합하여 본 발명의 울금 및 연잎 조합 추출물을 수득할 수

있다.

- [0030] 또한 본 발명은 상기 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 울금 및 연잎 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 동맥경화성 혈관계 질환 또는 비만증의 치료 및 예방을 위한 약학 조성물 및 건강기능식품을 제공한다.
- [0031] 상기에서 제조된 울금 및 연잎 조합 생약 추출물이 울금과 연잎을 개개 단독 처리한 것보다 보다 상승적인 지방억제 효과가 있으며 (실험예 2); *in vitro* 상에서 보다 상승적인 총 콜레스테롤 억제 효과가 있고(실험예 3), 보다 상승적인 CETP 활성 저해 효과를 나타내며 (실험예 4), *in vivo* 상에서 보다 상승적인 총 콜레스테롤 억제 효과가 있음을 확인함으로써(실험예 5) 상승적으로 항 콜레스테롤 효과 및 비만의 예방 및 치료효과 있음을 확인하여, 상기 조성물은 동맥경화성 혈관계 질환 또는 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물 또는 건강기능식품으로 유용함을 확인하였다.
- [0032] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 울금 및 연잎 조합 추출물을 0.01 내지 99% 중량으로 포함한다.
- [0033] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 이에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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, 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 적어도 먼, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 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, 동결건조제, 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 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 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, 추출물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러므로 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 및 직장, 또는 정맥등의 방법을 통하여 투여 할 수 있다.
- [0038] 또한 본 발명은 울금 및 연잎 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 동맥경화성 혈관계 질환 및 비만증의 개선 및 예방을 위한 건강기능식품을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 추출물을 포함하는 건강기능식품은 비만증의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 침출차, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0040] 따라서 또한, 본 발명은 동맥경화성 혈관계 질환 및 비만증의 예방 및 개선 효과를 갖는 울금 및 연잎 조합

추출물을 유효성분으로 함유하는 식품 또는 식품첨가제를 제공한다.

- [0041] 본 발명의 추출물을 첨가 가능한 식품형태는 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강 보조 식품류인 식품 등을 포함한다.
- [0042] 본 발명의 추출물은 비만증의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량 %로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물의 혼합물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 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 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 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 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0044] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(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 조성물들은 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 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

### 발명의 효과

- [0045] 본 발명의 울금 및 연잎 조합 추출물은 울금과 연잎을 개개 단독 처리한 것보다 보다 상승적인 지방억제 효과가 있으며 (실험예 2); in vitro 상에서 보다 상승적인 총 콜레스테롤 억제 효과가 있고(실험예 3), 보다 상승적인 CETP 활성 저해 효과를 나타내며 (실험예 4), in vivo 상에서 보다 상승적인 총 콜레스테롤 억제 효과가 있음을 확인함으로써(실험예 5), 상기 조성물은 동맥경화성 혈관계 질환 또는 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물 또는 건강기능식품으로 제공가능하다.

### 도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 3T3-L1 cell line과 HepG2 cell line에서 울금과 연잎 추출물의 세포 독성을 확인한 도이며;
- 도 2는 울금, 연잎 추출물 혼합물의 세포 독성을 3T3-L1 cell line에서 확인한 도이며;
- 도 3은 전체적 3T3-L1 cell 분화 진행과정을 나타낸 도이며;
- 도 4은 울금이 중성지방 축적 억제 효과가 있는지 여부를 in vitro 비만 실험인 Oil Red O staining 법으로 확인한 도이며;
- 도 5은 연잎이 중성지방 축적 억제 효과가 있는지 여부를 in vitro 비만 실험인 Oil Red O staining 법으로 확인한 도이며;
- 도 6은 울금, 연잎, 울금+연잎 추출물 혼합물이 중성지방 축적 억제 효과가 있는지 여부를 in vitro 비만 실험인 Oil Red O staining 법으로 확인한 도이며;
- 도 7은 전체적 지방산 모델 확립 진행과정을 나타낸 도이며;
- 도 8은 울금, 연잎 추출물이 세포 내 총 콜레스테롤에 영향을 미치는지 영향을 확인한 도이며;
- 도 9은 3T3-L1 cell line과 HepG2 cell line에서 울금과 연잎 추출물의 세포 독성을 확인한 도이며;

도 10은 울금 열수 추출물(CLW)과, 연잎 20% 주정 추출물(NN20E)의 세포 내 총 콜레스테롤 저해 정도를 확인한 도이며;

도 11은 울금 열수 추출물(CLW)과, 연잎 열수 추출물(NNW)의 CETP 저해 활성을 측정한 도이며;

도 12은 울금 (20%, 80% 주정) 추출물과, 연잎 (20%, 80% 주정) 추출물의 CETP 저해 활성을 측정한 도이며;

도 13은 실험동물을 이용한 지질대사 및 콜레스테롤 개선 능력 확인한 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0047] 이하, 본 발명을 하기 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0048] 단, 하기 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

**실시예 1. 시료의 제조**

1-1. 울금 추출물(CL)의 제조

[0051] 진도울금농장(전라남도 진도군)에서 구입한 울금을 자연건조한 후 세척 및 세절한 500g에 물, 20% 주정, 및 80% 주정을 10배량(v/w) 가하여 90℃ 이상의 온도에서 환류추출법으로 2시간동안 2회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman사)로 여과한 후, 감압농축(Eyela, Rotary Evaporator N-1000) 및 동결건조(Eyela, Freeze Dryer FDU-540)하여 울금의 물, 20% 주정, 및 80% 주정 추출물 각각 90g, 78g 및 68g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.(이하, 각각 “CLW”, “CL20E” 및 “CL80E”라 명명함)

1-2. 연잎 추출물 (NN)의 제조

[0053] 다연(주)(전라남도 무안군)에서 구입한 연잎 500g을 사용하는 점만 달리하고 모든 과정은 상기 1-1과 동일한 과정을 수행하여 연잎의 물, 20% 주정, 및 80% 주정 추출물 각각 72g, 67.5g 및 54.5g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.(이하, 각각 “NNW”, “NN20E” 및 “NN80E”라 명명함)

1-3. 울금 및 연잎 조합 추출물의 제조

[0055] 상기 실시예 1-1에서 얻은 울금의 물, 20% 주정, 및 80% 주정 추출물 및 실시예 1-2에서 얻은 연잎 물, 20% 주정, 및 80% 주정 추출물을 1:1의 배합 중량비 (w/w)로 균질하게 배합하여 하기 표 1의 다양한 조합의 울금 및 연잎 조합 추출물들을 제조하여 하기 실험예에 시료로 사용하였다.

**표 1**

울금 및 연잎 조합

	CLW:NNW =1:1(w/w)	CLW: NN20E =1:1(w/w)	CL20E:NN20E =1:1(w/w)	NN20E:NN80E =1:1(w/w)
명명	cmb1	cmb2	cmb3	cmb4

**실험예 1. 세포독성 확인**

[0058] 상기 실시예 1에서 얻은 사료의 세포독성을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 MTT 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 실시하였다(Carmichael J, et al., 3805.Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing., Cancer Res. 1987 Feb 15;47(4):936-42.).

[0059] 3T3-L1 세포(CL-173, ATCC)와 HepG2 세포(88065, 한국 세포주 은행, KCLB)의 세포독성은 MTT법으로 평가하였다. 전지방세포주인 3T3-L1 세포 배양액으로는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, 11995073, Gibco사)에 10% bovine calf serum(BCS)과 1% penicillin/streptomycin (P/S)를 첨가하여 사용하였고, 간암세포주



인 HepG2 세포 배양액으로는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, 11995073, Gibco 사)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (P/S)를 첨가하여 사용하였다. 세포가 80-90% confluence 하면 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨 뒤, 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well 농도로 seeding 하였다. 세포를 overnight 시킨 후, 시료(sample)를 최종 농도에 희석하여 동일한 부피로 각 웰(well)에 첨가하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양(incubator) 조건하에서 24시간 배양하였다. 이후 MTT를 각 웰(well)에 넣은 다음 4시간 동안 배양(incubation) 한 뒤 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 ELISA reader(SPECTRA MAX190, Molecular Devices)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 증식을 판별하였다.

[0060] 본 실험 결과, 3T3-L1 cell line과 HepG2 cell line에서 울금(열수, 20% 80% EtOH), 연잎(열수, 20% 80% EtOH) 추출물을 대상으로 MTT test를 이용하여 세포독성을 확인하였다. 울금 (열수, 20% 80% EtOH) 추출물의 경우, 300 µg/mL에서 무처리군과 비교하여 cell viability가 거의 감소하지 않았으므로 세포독성 최대안전범위로서 300 µg/mL 이하로 설정 하였다. 연잎 (열수, 20% 80% EtOH) 추출물은 실험 결과, 300 µg/mL 에서 무처리군과 비교하여 cell viability가 거의 감소하지 않았으므로 연잎 추출물의 최대안전범위로는 300 µg/mL 이하로 설정하였다. 울금, 연잎 두 소재 모두 두드러진 세포 독성을 나타내지는 않았다. (도 1)

[0061] 울금(열수, 20% 80% 주정), 연잎(열수, 20% 80% 주정) 추출물 혼합물을 대상으로 MTT test를 이용하여 세포독성을 확인하였다. 연잎(열수, 20% 80% EtOH) 추출물과 울금 (열수, 20% 80% EtOH) 추출물들을 1:1의 비율로 혼합하여 농도별 세포독성을 확인한 결과, 각각 1,000 µg/ml의 농도까지 세포에 독성을 미치지 않음을 확인 하였다.(도 2)

[0062] **실험예 2. in vitro 상 비만 효과 확인 실험**

[0063] 상기 실시예에서 얻은 사료의 in vitro 상 비만효과를 확인하기 위하여 문헌에 게시된 Oil Red O staining 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 실시하였다(Phillips M et al., Inhibition of 3T3-L1 adipose differentiation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, J Cell Sci. 1995 Jan;108(Pt 1):395-402).

[0064] 2-1. 지방분화

[0065] 전구지방세포인 3T3-L1 cell의 세포 배양액으로는 DMEM에 10% BCS, 1% P/S를 첨가하여 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기(incubator)에서 배양하였다. 세포가 80% confluent 되면 trypsin-EDTA (25300054, Gibco 사)를 처리하여 세포를 분리하여 원심분리기에서 세포를 모은 후 suspension 용액을 만들어 6-well plate에 접종 (seeding) 하였다. 2일후 세포가 confluent 되면 배지를 바꿔주었고, 2일 더 배양하여 post-confluent 하게 하였다. 세포가 post-confluent하게 되면 10% Fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 DMEM 배양액(DMEM, 11995073, Gibco 사)에 0.5mM IBMX(I5879, sigma), 1µM dexamethasone(D1756, sigma), 10µg/ml insulin (I3536, sigma)이 첨가된 differentiation을 처리하여 분화를 유도하였다. 분화 2일째에는 10µg/ml insulin 만 포함된 배양액으로 교환하였고, 4, 6일째에는 insulin이 함유되어 있지 않은 배양액으로 세포를 배양하였다. 전체적 3T3-L1 cell 분화 진행과정은 도 3과 같다.

[0066] 2-2. 실험과정

[0067] Oil Red O stock solution 은 0.35g Oil Red O 시약(O0625, sigma)을 100ml 의 isopropanol에 녹였다. Oil Red O working solution은 60% Oil Red O stock solution을 넣고 40%는 증류수를 넣어 실험에 사용하였다. 분화시작일로부터 8일째 되던 날 배지를 제거하고 세포 배양액을 PBS로 씻어낸 후 10% formaldehyde를 2ml 씩 각 well에 넣고 1시간 동안 고정시켰다. formaldehyde를 제거하고 증류수로 씻어낸 후 각 well 에 Oil Red O working solution을 1ml씩 넣고 실온에서 30분 동안 염색한 후 증류수로 3회 반복하여 씻어냈다. 염색이 된 세포는 현미경으로 관찰 후 디지털 카메라(D600, Nikon)로 사진 찍었으며 100% isopropanol을 가하여 세포내에 축적된 lipid를 용출하여 96-well plate에 옮긴 후 500nm에서 흡광도를 측정하여 lipid accumulation 정도를 평가하였다.

[0068] 2-3. 실험 결과

[0069] 지방 생성 억제 효과가 중성지방의 축적 정도와의 관련이 있는지 알아보기 위하여 3T3-L1 cell line을 지방으로 분화시키고 시료를 처리하여 중성지방만을 붉은 색으로 염색하는 Oil Red O 염색법을 통해 중성지방의 양을 측정된 결과, 울금 추출물 (열수, 20% 주정 추출물) 처리에 의한 약간의 지방 생성 억제 효과를 확인할 수 있었다. (도 4 참조)

[0070] 연잎 추출물(열수, 20% 주정 추출물, 80% 주정 추출물)에서는 낮은 농도에서부터 농도 의존적인 지방분화 억제효과가 나타났다. (도 5 참조). 각각의 추출물에서는 울금에서는 특히 열수 추출물(CLW)이, 연잎에서는 특히 20% 주정 추출물(NN20E)이 지방 생성 억제 효과가 뛰어난 것으로 보인다.

[0071] 앞의 실험에서 울금에서는 특히 열수 추출물(CLW)이, 연잎에서는 특히 20% 주정 추출물(NN20E)이 효과가 뛰어난 것으로 확인하였기 때문에 울금 열수추출물과 연잎 20% 주정추출물을 혼합하여 지방억제 효과를 다시 살펴 보게 되었다. 울금 열수 추출물과 연잎 20% 주정 추출물을 혼합하여 실험 하였을 때에도 지방 생성 억제 효과가 농도 의존적으로 단독 처리한 것 보다 혼합 배합물이 보다 상승적인 지방억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다 (도 6 참조).

[0072] **실험예 3. 세포 내 총 콜레스테롤 저해 정도 측정**

[0073] 상기 실시예에서 얻은 사료의 세포 내 총 콜레스테롤 저해 정도를 측정하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 실시하였다 (Ting-Tsz Ou et al., Mulberry extract inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance, *J Sci Food Agric* 2011; 91: 27402748).

[0074] 3-1. 지방산 모델 확립

[0075] 혈중 콜레스테롤양의 조절에 중요한 역할을 하는 간세포를 실험에 사용하였다. 이 실험에 사용된 HepG2 cell 은 사람의 주요 apo단백질을 합성하는 능력을 가지고 있는데, 이는 사람의 간과 소장엔 존재하는 apo단백질과 동일한 것들이므로 lipoprotein의 대사에 관한 연구에 사용하기에 적절하여 사용하였다. HepG2 cell (88065, 한국 세포주 은행(KCLB)의 세포 배양액으로는 DMEM에 10% FBS, 1% P/S를 첨가하여 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (HERAcell1150i, Thermo science)에서 배양하였다. 세포가 75% 정도 confluent 되면 serum-free DMEM으로 바꿔준 후, 0.66mM Oleic acid + 0.33mM Palmitic acid + 1% bovine serum albumin (BSA) 혼합물을 배지에 첨가하여 간암세포의 fat-overloading 을 유도하였다. 전체적 지방산 모델 확립 진행과정은 도 7과 같다 (도 7 참조).

[0076] 3-2. 세포 내 총 콜레스테롤 측정

[0077] 간암세포인 HepG2 세포주를 이용하여 총 콜레스테롤 함량을 측정하였다. HepG2 세포 배양액으로는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (P/S)를 첨가된 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건하에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하였다. 세포가 75% 정도 confluent 되면 serum-free DMEM으로 바꿔준 후, 0.66mM Oleic acid + 0.33mM Palmitic acid + 1% bovine serum albumin (BSA) 혼합물과 시료 추출물을 배지에 첨가하여 배양하였다. 그 후 상층액을 제거한 다음 1% 에탄올을 함유하는 PBS로 세포를 1회 세척하고 다시 에탄올이 첨가되지 않은 PBS로 세포를 3회 세척한 후 lysis 시켜 총 콜레스테롤 함량을 효소법에 의한 kit (AM202-K, Asan Pharm)를 사용하여 흡광도를 측정과장 500nm에서 측정하였고, 단백질을 정량하여 콜레스테롤 양을 산출하였다.

[0078] 3-3. 실험 결과

- [0079] 총 콜레스테롤 측정 실험에는 혈중 콜레스테롤양의 조절에 중요한 역할을 하는 간세포를 실험에 사용하였다. HepG2 cell은 사람의 주요 apo단백질을 합성하는 능력을 가지고 있는데, 이는 사람의 간과 소장엔 존재하는 apo단백질과 동일한 것들이므로 lipoprotein의 대사에 관한 연구에 사용하기에 적절하여 사용하였다. 시료에 의한 세포내 총 콜레스테롤을 측정된 결과, 울금 열수 추출물(CLW)이 총 콜레스테롤 억제 효과가 있음을 농도 의존적으로 확인하였다. 연잎은 모든 추출물에서 (열수, 20%, 80% 주정) 총 콜레스테롤 억제 효과를 확인하였고, 특히 20% 주정 추출물(NN20E)이 유의적인 총 콜레스테롤 억제 효과가 있음을 농도 의존적으로 확인하였다. (도 8 참조).
- [0080] 총 콜레스테롤을 저해 정도를 살펴보았을 때, 울금, 연잎이 농도 의존적으로 총 콜레스테롤 억제 효과가 있음을 확인 할 수 있었고, 연잎의 총 콜레스테롤 억제 효과가 크다는 것을 확인할 수 있었다. (도 9 참조).
- [0081] 총 콜레스테롤 저해 정도를 각각 비교하였을 때, 울금 열수 추출물(CLW)과 연잎 20% 주정 추출물(NN20E)의 효과가 크다는 것을 확인하였기 때문에 울금, 연잎의 혼합물 실험에 두 시료를 사용하기로 결정하였다. 울금 열수 추출물과 연잎 20% 주정 추출물 혼합물의 총 콜레스테롤 저해 정도를 살펴보았을 때, 단독 처리한 것 보다 혼합 배합물이 보다 상승적인 총 콜레스테롤 억제 효과가 있음을 확인하였다. (도 10 참조).
- [0082] **실험예 4. CETP 저해제 어세이법**
- [0083] 상기 실시예에서 얻은 사료의 CETP 저해제 어세이법을 측정하기 위하여 CETP inhibitor assay kit (K602-100)를 이용하여 하기와 같이 실험을 실시하였다.
- [0084] 4-1. CETP inhibitor assay
- [0085] CETP inhibitor assay kit (K602-100)는 Biovision 사로부터 구입하였다. HDL은 동맥경화화 심혈관질환을 예방하는 작용을 하기 때문에, CETP는 CETP 효소 활성을 억제시킬수록 항콜레스테롤 효과가 크다는 의미이기 때문에 측정하였다.
- [0086] 실험방법은 96-well plate 에 160  $\mu$ l의 샘플을 넣은 후, Rabbit Serum (K602-100-4) 3  $\mu$ l씩 첨가하였다. 각 well에 Donor molecule (K602-100-1) 10  $\mu$ l, Acceptor molecule (K602-100-2) 10  $\mu$ l, 10X CETP assay buffer (K602-100-3)를 20  $\mu$ l 씩 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 incubation 하였다. 형광강도는 여기파장 465nm, 측정파장 535nm에서 측정하였다.
- [0087] 4-2. 실험 결과
- [0088] CETP는 VLDL이나 LDL로부터 중성지방을 뽑아내어 HLD의 콜레스테롤에스테르와 교환하는 역할을 한다. HDL은 동맥경화화 심혈관질환을 예방하는 작용을 하기 때문에, CETP을 CETP 효소 활성을 억제시킬수록 항콜레스테롤 효과가 크다는 의미이다. 울금 열수 추출물(CLW)과 연잎 열수 추출물(NNW)을 각각 농도 별로 처리하여 CETP 저해 활성을 측정된 결과 농도 의존적인 유의한 저해효과가 나타났다. 그리고 울금 열수 추출물과 연잎 열수 추출물 혼합물을 농도 별로 처리하여 CETP 저해 활성을 측정된 결과 울금과 연잎을 단독 처리한 것 보다 큰 CETP 저해 효과가 나타났다. (도 11 참조).
- [0089] 마찬가지로 울금 20%(CL20E, 도 12-a), 연잎 20%(NN20E, 12-b), 울금 80%(CL80E, 도 12-c), 연잎 80%(NN80E, 도 12-d) 주정추출물을 농도 별로 처리하여 CETP 저해 활성을 측정된 결과 연잎은 저 농도에서부터, 울금은 고농도일수록 농도 의존적인 저해효과가 나타났다. (도 12 참조).
- [0090] **실험예 5. 실험동물을 이용한 지질대사 및 콜레스테롤 개선 능력 검색**
- [0091] 상기 실시예에서 얻은 사료의 실험동물을 이용한 지질대사 및 콜레스테롤 개선 능력을 측정하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 실시하였다 (Hiroshi Hirata et al., Xanthohumol Prevents Atherosclerosis by Reducing Arterial Cholesterol Content via CETP and Apolipoprotein E in CETP-Transgenic Mice, PLoS One. 2012; 7(11): e49415).

[0092] 5-1. 실험동물 안정화 및 사육 환경

[0093] 실험동물은 ICR mouse (수컷, 10주령, 86마리, 샘타코)를 이용하였다. 물과 사료는 자유 섭취시키면서 처음 3 일간의 안정화를 거친 후 몸무게와 총 콜레스테롤을 측정한 후에 군 분리를 하였다. 사육실 온도는 23 ± 2℃, 상대습도는 60 ± 5%를 유지시키고, 12시간 주기로 명암이 유지되는 사육실에서 사육하였다.

[0094] 5-2. 실험 식이 및 시료 투여

[0095] 실험 식이는 정상식이군은 보통 사료(Naive, 퓨리나 사료), CTL 및 실험군은 고 콜레스테롤 식이(D12336, Research Diets)를 섭취시켰다.(표 2참조)

[0096] 실험 군을 연일 20% 주정, 울금 열수추출물 (단독 100, 300 mg/kg, 혼합 150 mg/kg 씩), omega-3 (100 mg/kg)으로 나누었고, 각각의 추출물은 saline에 녹여 200 μl 씩/ Naive 및 CTL은 saline 만 투여/ omega 3((주) 캠포트)는 bean oil(sigma)에 희석하여 경구 투여하였다. 실험시료는 전 실험기간동안 매일 일정 시간에 존대를 이용하여 경구 투여하였다.

표 2

[0097] 고 콜레스테롤 식이 (Research Diet, D12336) 조성

product#	D12336	
	Ingredient	gm
Casein, 30 Mesh	75	300
Soy protein	130	520
DL-Methionine	2	8
Corn Starch	275	1100
Maltodextrin 10	150	600
sucrose	30	120
Cellulose, BW200	90	0
Soy Bean oil	50	450
Cocoa Butter	75	675
Coconut oil, 76	35	315
Mineral Mix S10001	35	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Sodium chloride	8	0
Potassium citrate	10	0
vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
Cholesterol, USP	12.5	0
Sodium cholic acid	5	0
FD&C Red dye #40	0.1	0
FD&C Blue dye #1	0	0
<b>Total</b>	<b>1000.1</b>	<b>4128</b>

[0098] 5-3. 채혈 및 측정

[0099] 체중과 식이 섭취량은 전 실험기간동안 매일 일정 시간에 측정하였고, 사육 기간 동안의 혈액 콜레스테롤 변화를 관찰하기 위해 사육 전, 사육 후 각각 쇄골 대정맥 채혈 방법으로 혈액을 채취해 원심 분리하여 혈장을 분리하여 콜레스테롤을 측정하였다. 식이 효율(feed efficiency ratio, FER)은 1주간의 체중증가량을 1주간의 식이섭취량으로 나눈 값으로 하였다.

[0100] 5-4. 평가

[0101] 건강기능식품의 기능성가이드(식품의약품안전청, 2013.03)의 체지방 감소 기능성 시험항에 준하여 in vitro 상에서 CETP inhibitor assay, Oil Red O staining, 세포 내 총 콜레스테롤 측정 평가와 in vivo 상에서 콜레

스테롤 억제 활성 평가를 수행하였다.

[0102] 5-5. 실험 결과

[0103] 올금, 연잎, 올금 연잎 혼합물을 각각 농도 별로 일주일 동안 경구 투여하였다. 마우스 혈액을 채취하여 총 콜레스테롤을 측정된 결과 올금, 연잎 단독 처리군 보다 올금과 연잎 혼합물 처리군에서 보다 상승적인 총 콜레스테롤 저해효과가 나타났다. (표 3 및 도 13 참조).

표 3

[0104] 총콜레스테롤수준에 미치는 영향실험

	총 콜레스테롤 (mg/dl)	
	0 일차	7 일차
Naive	93.10 ± 6.48	102.08 ± 9.41
CTL	87.77 ± 11.44	138.11 ± 8.90
N100	88.32 ± 8.00	148.25 ± 15.32
N300	88.44 ± 13.05	140.64 ± 13.35
C100	88.84 ± 3.40	130.38 ± 18.99
C300	88.54 ± 9.59	149.95 ± 14.95
NC150	89.12 ± 10.60	128.02 ± 7.40*
Omega 3	86.84 ± 10.19	133.67 ± 13.27
bean oil	83.00 ± 33.73	130.10 ± 11.24

CTL : 고콜레스테롤식이 섭취군; N100 : 연잎100 mg/kg; N300 : 연잎300 mg/kg; C100 : 올금100 mg/kg; C300 : 올금300 mg/kg; NC150 : 연잎+올금 각각 150 mg/kg 혼합; omega 3: 100 mg/kg

[0105] 올금, 연잎, 올금 연잎 혼합물을 투여한 마우스의 몸무게 변화량은 거의 없었고 식이 섭취량도 거의 비슷하였다. (표 4 참조).

표 4

[0106] 실험 동물의 몸무게 변화량 및 식이섭취량 (수정)

	몸무게 (g)		식이섭취량 (g)
	0 일차	7 일차	
Naive	35.23 ± 1.38	36.25 ± 1.88	4.59 ± 0.65
CTL	34.60 ± 1.46	35.28 ± 1.79	3.86 ± 0.50
N100	35.96 ± 0.93	36.72 ± 1.29	3.81 ± 0.44
N300	35.65 ± 0.88	35.86 ± 1.20	3.72 ± 0.41
C100	35.25 ± 0.84	35.91 ± 1.02	3.76 ± 0.51
C300	35.77 ± 2.09	37.78 ± 1.80	3.99 ± 0.52
NC150	35.89 ± 0.56	35.72 ± 1.21	3.60 ± 0.50
Omega 3	34.99 ± 1.02	35.95 ± 1.66	3.37 ± 0.53**
bean oil	34.37 ± 1.80	35.94 ± 1.39	3.96 ± 0.55

CTL : 고콜레스테롤식이 섭취군; N100 : 연잎100 mg/kg; N300 : 연잎300 mg/kg; C100 : 올금100 mg/kg; C300 : 올금300 mg/kg; NC150 : 연잎+올금 각각 150 mg/kg 혼합; omega 3: 100 mg/kg

[0107] 이에 본 발명의 추출물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0108] 제제예 1. 산제의 제조

- [0109] Cmb1 ----- 200 mg
- [0110] 유당 ----- 100 mg
- [0111] 탈크 ----- 10 mg
- [0112] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0113] **제제예 2. 정제의 제조**

- [0114] Cmb2 ----- 200 mg
- [0115] 옥수수전분 ----- 100 mg
- [0116] 유당 ----- 100 mg
- [0117] 스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg
- [0118] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0119] **제제예 3. 캡셀제의 제조**

- [0120] Cmb3 ----- 200 mg
- [0121] 결정성 셀룰로오스 ----- 3 mg
- [0122] 락토오스 ----- 14.8 mg
- [0123] 마그네슘 스테아레이트 ----- 0.2 mg
- [0124] 통상의 캡셀제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡셀제를 제조한다.

[0125] **제제예 4. 주사제의 제조**

- [0126] Cmb4 ----- 200 mg
- [0127] 만니톨 ----- 180 mg
- [0128] 주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg
- [0129] Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O ----- 26 mg
- [0130] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0131] **제제예 5. 액제의 제조**

- [0132] Cmb1 ----- 200 mg
- [0133] 이성화당 ----- 10 g
- [0134] 만니톨 ----- 5 g
- [0135] 정제수 ----- 적량
- [0136] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0137] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

[0138]	Cmb2 -----	1000 mg
[0139]	비타민 혼합물 -----	적량
[0140]	비타민 A 아세테이트 -----	70 $\mu$ g
[0141]	비타민 E -----	1.0 mg
[0142]	비타민 B1 -----	0.13 mg
[0143]	비타민 B2 -----	0.15 mg
[0144]	비타민 B6 -----	0.5 mg
[0145]	비타민 B12 -----	0.2 $\mu$ g
[0146]	비타민 C -----	10 mg
[0147]	비오틴 -----	10 $\mu$ g
[0148]	니코틴산아미드 -----	1.7 mg
[0149]	엽산 -----	50 $\mu$ g
[0150]	판토텐산 칼슘 -----	0.5 mg
[0151]	무기질 혼합물 -----	적량
[0152]	황산제1철 -----	1.75 mg
[0153]	산화아연 -----	0.82 mg
[0154]	탄산마그네슘 -----	25.3 mg
[0155]	제1인산칼륨 -----	15 mg
[0156]	제2인산칼슘 -----	55 mg
[0157]	구연산칼륨 -----	90 mg
[0158]	탄산칼슘 -----	100 mg
[0159]	염화마그네슘 -----	24.8 mg

[0160] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성 하였지만, 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.

[0161] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0162]	Cmb3 -----	1000 mg
[0163]	구연산 -----	1000 mg
[0164]	올리고당 -----	100 g
[0165]	매실농축액 -----	2 g
[0166]	타우린 -----	1 g
[0167]	정제수를 가하여 -----	전체 900 ml

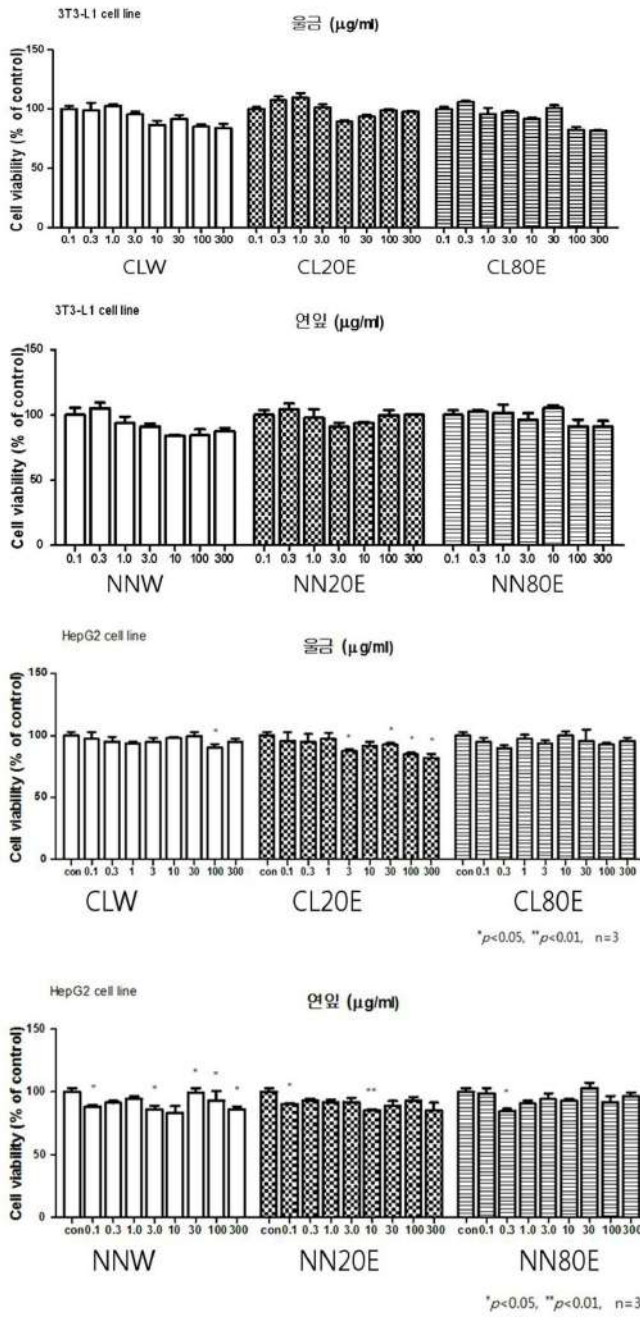
[0168] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0169] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가,

사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

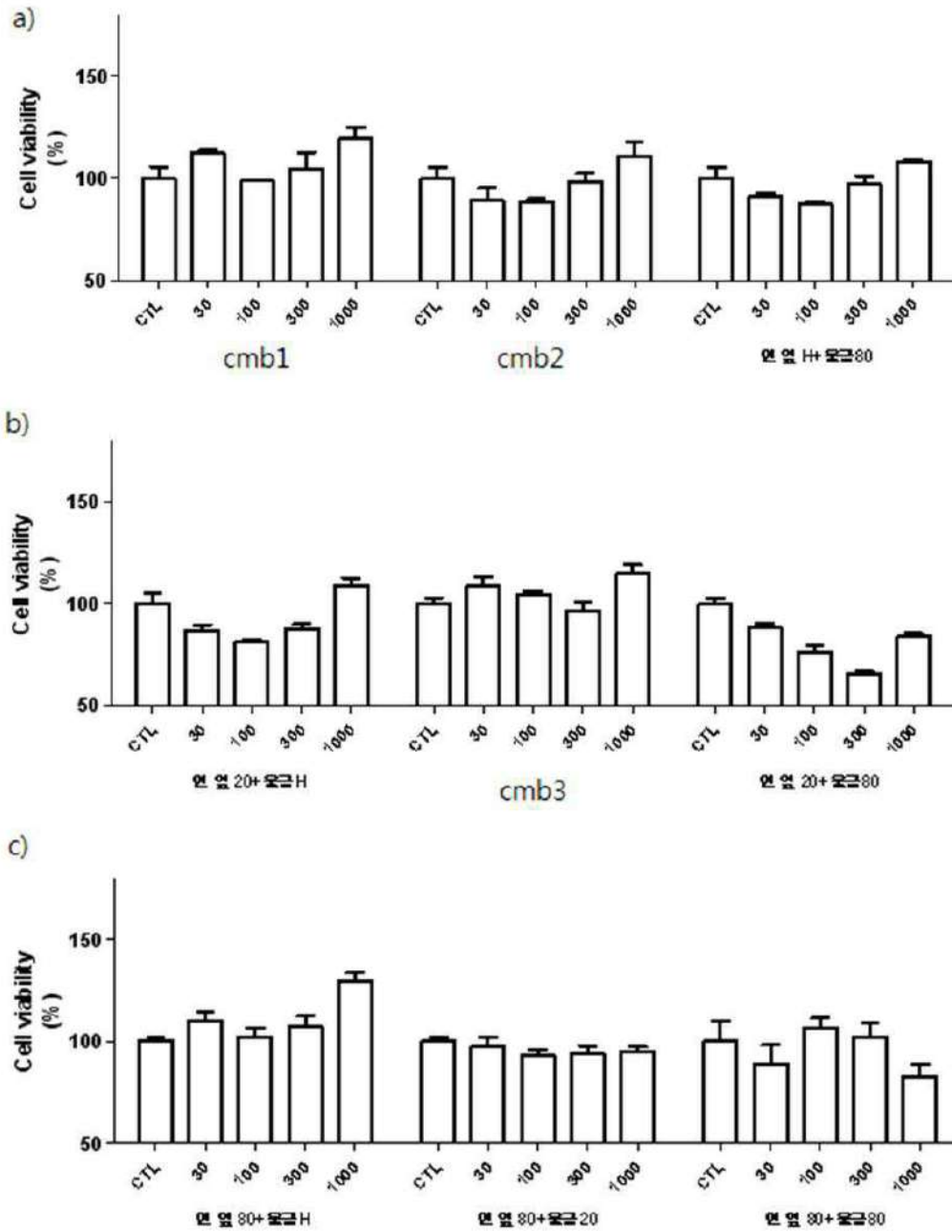
도면

도면1

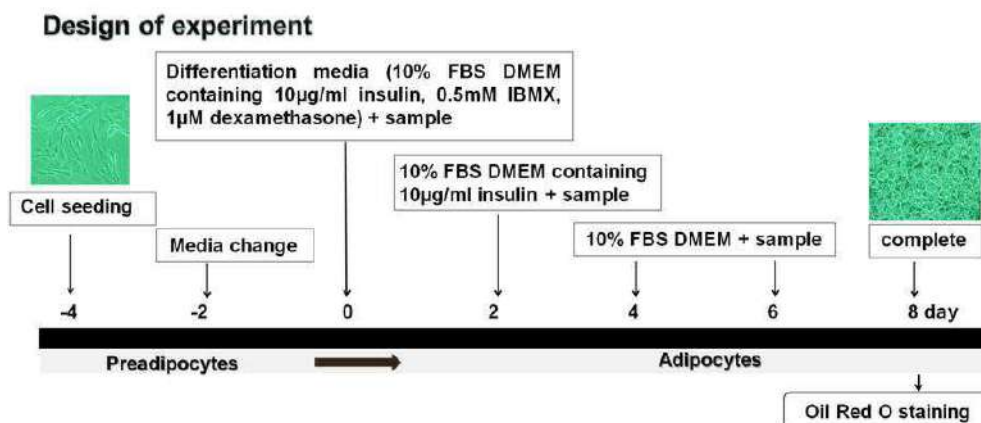




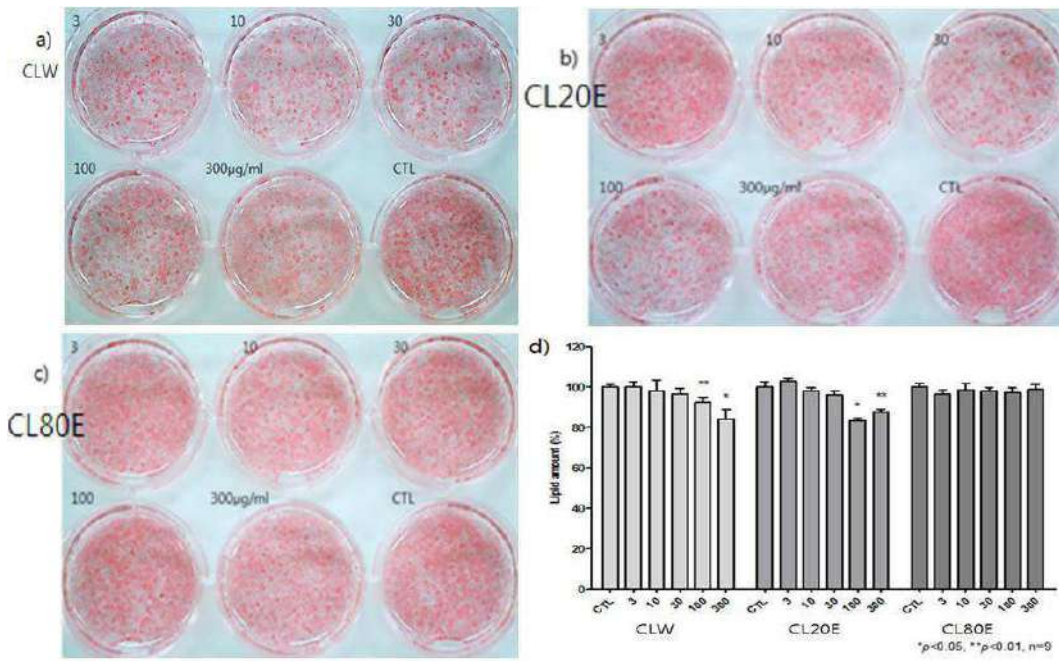
도면2



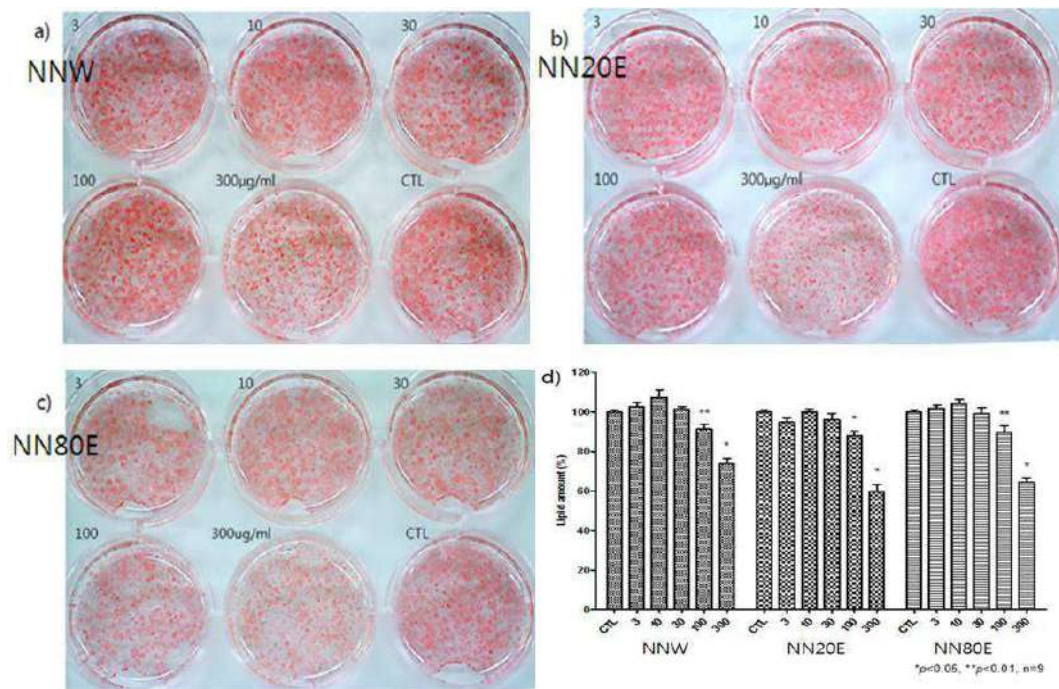
도면3



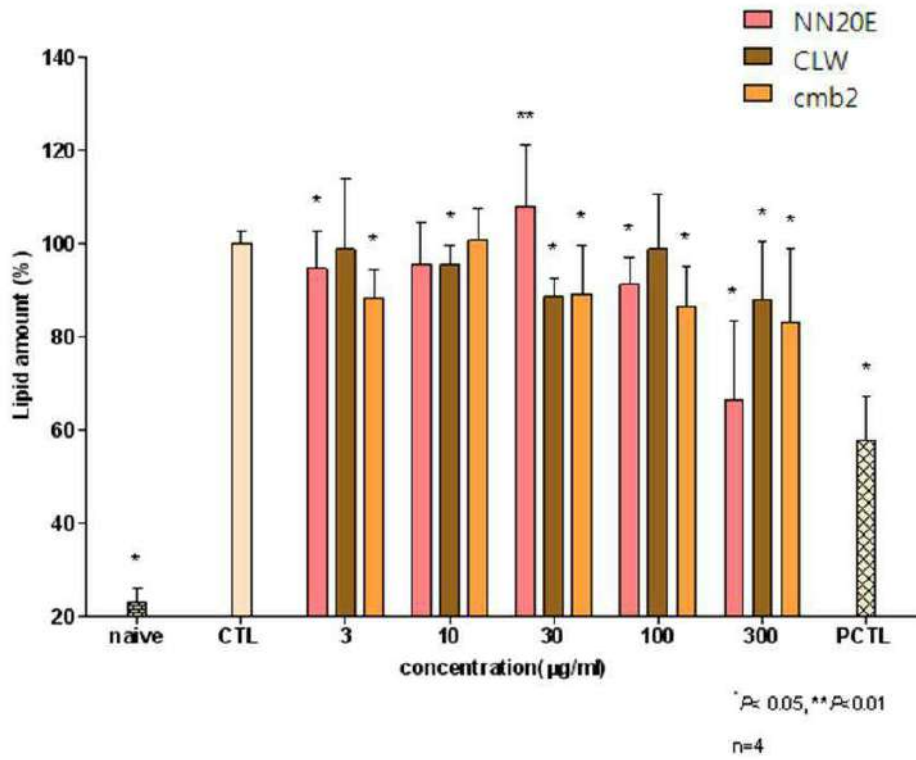
도면4



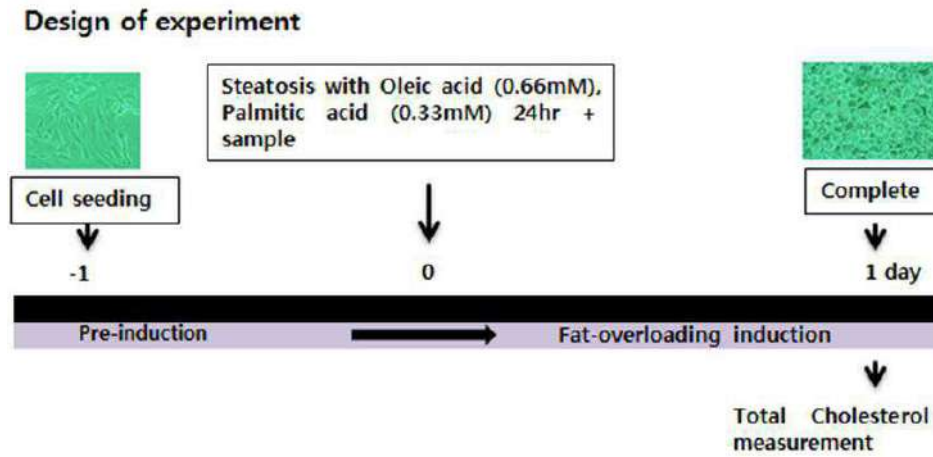
도면5



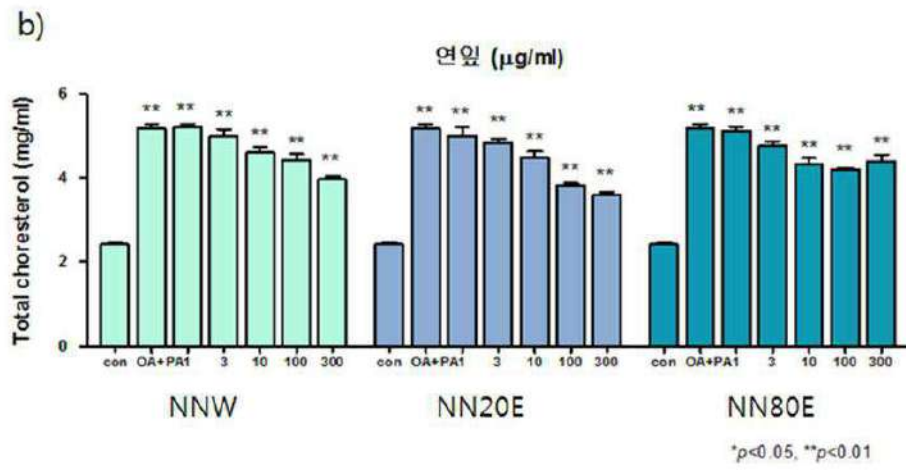
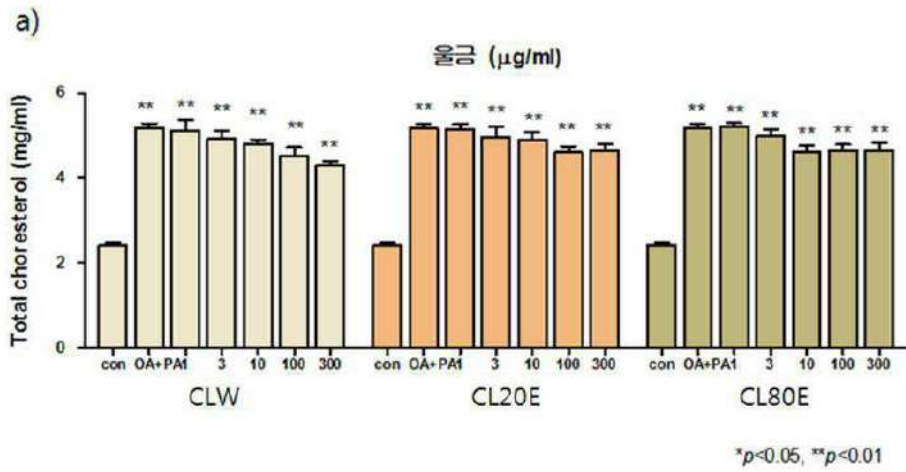
도면6



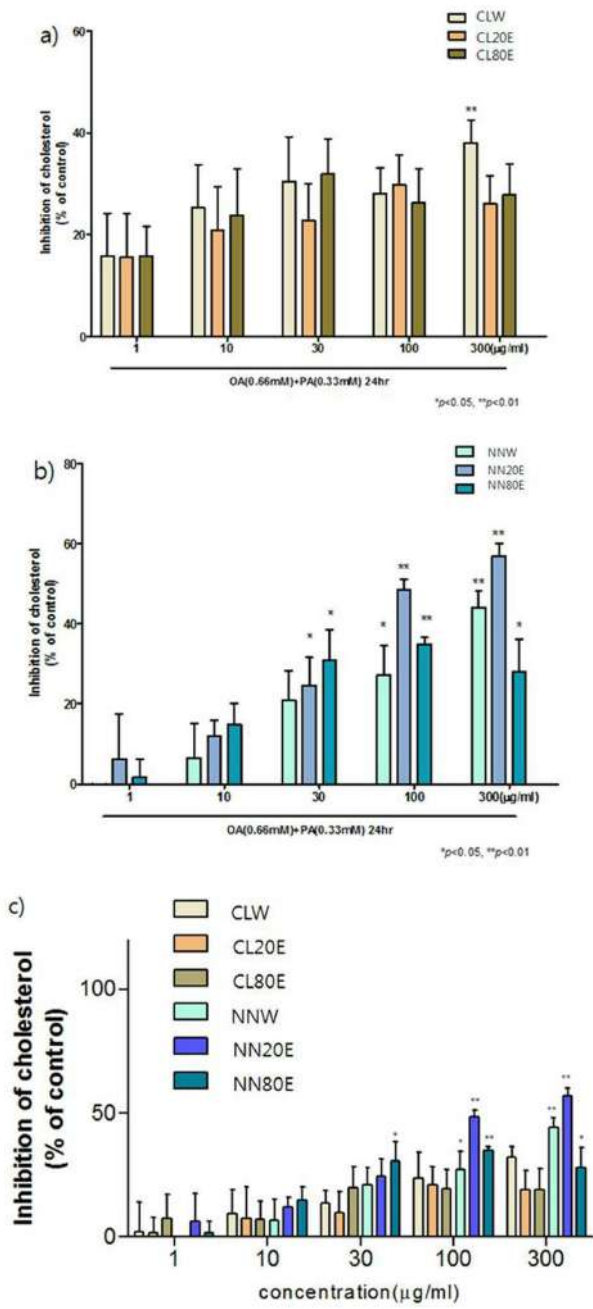
도면7



도면8

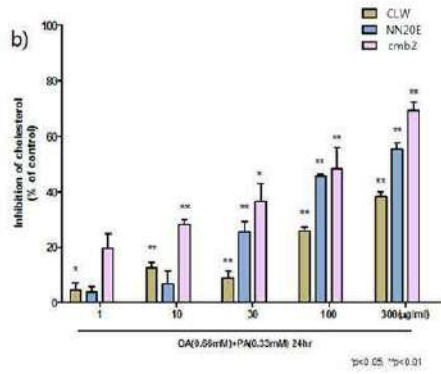
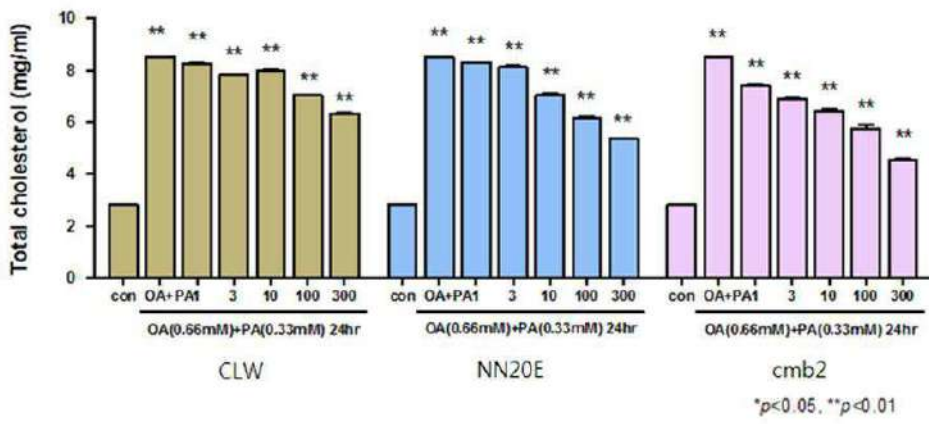


도면9

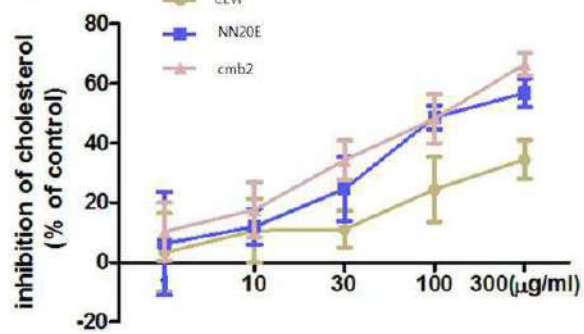


도면10

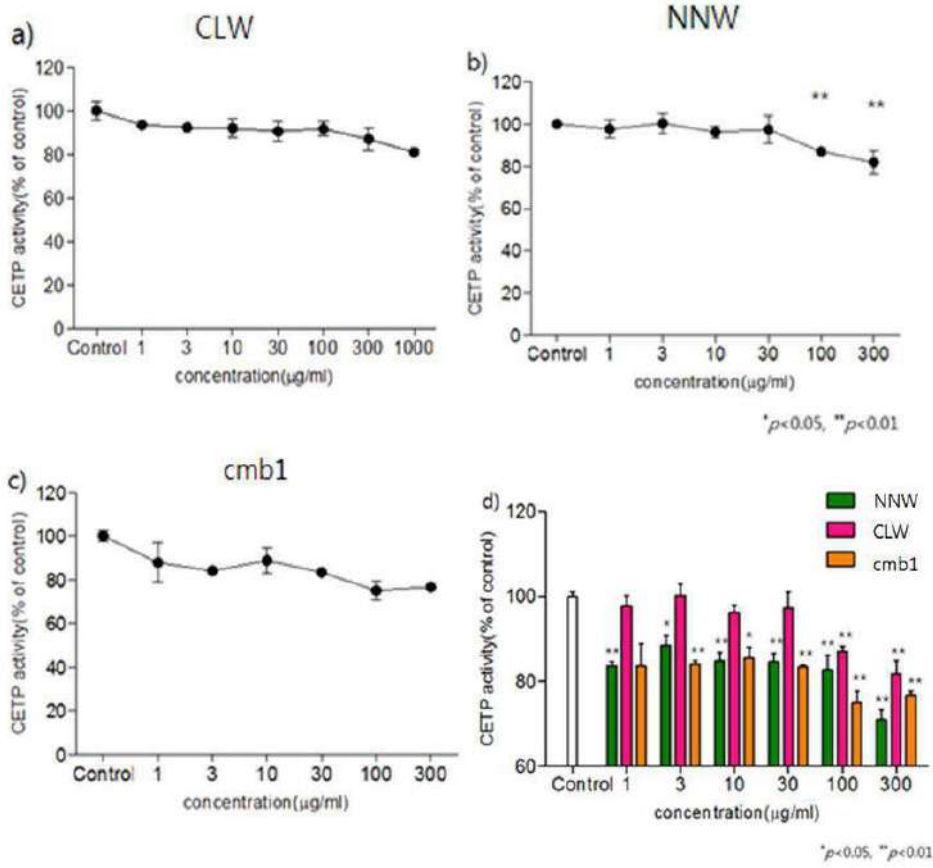
a)



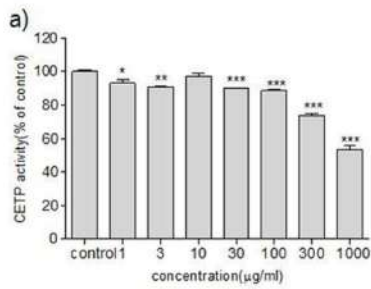
c)



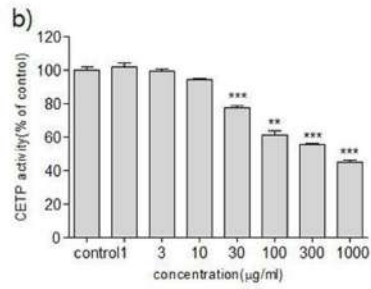
도면11



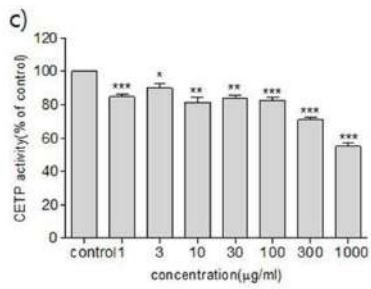
도면12



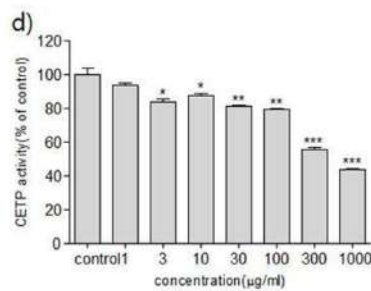
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.



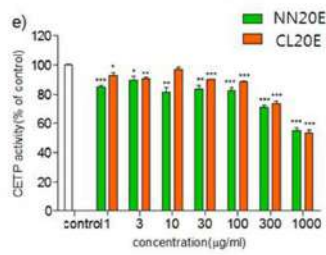
\*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.



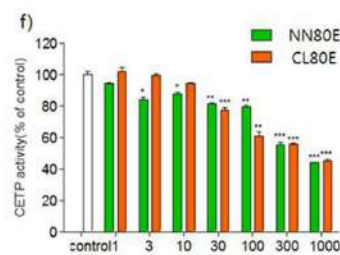
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.



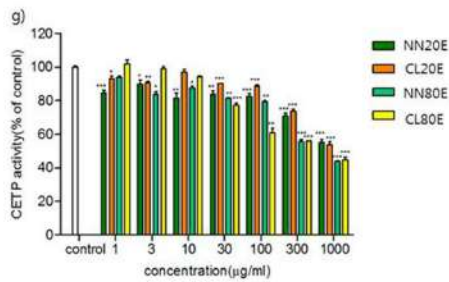
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.



\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.



\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.



\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. control.



도면13

