



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월12일
(11) 등록번호 10-1968891
(24) 등록일자 2019년04월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 21/25 (2016.01) A23L 2/38 (2006.01)
A61K 36/71 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A23L 21/25 (2016.08)
A23L 2/38 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0036268(분할)
- (22) 출원일자 2019년03월28일
심사청구일자 2019년03월28일
- (65) 공개번호 10-2019-0037219
- (43) 공개일자 2019년04월05일
- (62) 원출원 특허 10-2017-0020975
원출원일자 2017년02월16일
심사청구일자 2017년02월16일
- (30) 우선권주장
1020150109239 2015년07월31일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020130020095 A
KR1020150131487 A

- (73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
- (72) 발명자
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 10 호반중흥1단지 아
파트 105-203
반상오
광주광역시 북구 평교로29번길 23
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최석진

전체 청구항 수 : 총 4 항

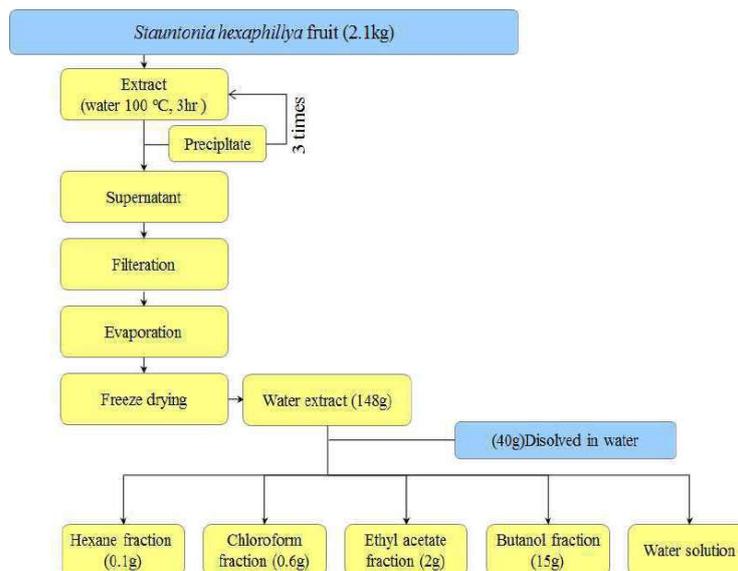
심사관 : 신현일

(54) 발명의 명칭 **멸꿀 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물**

(57) 요약

우리나라 천연자원인 멸꿀 열매 추출물을 유효성분으로 하는 혈중알콜농도 저감 촉진에 작용하는 고부가가치 기능성 건강식품을 제공하는 것으로, 본 발명의 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물은 인체에 부작용이 없으면서 혈중알콜농도 저감 촉진 작용이 우수하기 때문에 이를 유효성분으로 함유하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료는 복용이 용이하고 장기간 보관이 가능하여 음주 전, 후의 혈중알콜농도 저감 촉진에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 36/71 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/334 (2013.01)

(72) 발명자

장육진

전라남도 장흥군 장흥읍 장흥대로 3492 계명아파트
1005

강후원

광주광역시 남구 독립로 70-1 백운 우방아이유셀아
파트 107-402

김재용

전라남도 순천시 왕궁길 60 중흥파크맨션 304-207

이규욱

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136 성은연립
주택 101-404

박성운

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 215 부영6차아파트
606-705

이순택

경기도 고양시 일산서구 대화동2132-1

박세준

전남 장흥군 안양면 기산리 756

이동욱

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 41 수창아트빌 203

김선오

광주광역시 북구 양일로 52-1 연제2차대주피오레아
파트 201-1003

명세서

청구범위

청구항 1

멸꿀 열매 열수추출물을 유효성분으로 포함하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물

청구항 2

제1항의 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물은 체중 kg당 10-200mg의 양으로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료.

청구항 3

제1항의 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료.

청구항 4

제3항에 있어서, 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료에 포함되는 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물은 0.01 내지 95 중량%의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물 및 이를 이용한 음료에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 국내에 자생하는 천연원료를 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 멸꿀 열매 추출물을 함유하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물 및 이를 이용한 음료에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 멸꿀(*Stauntonia hexaphylla*)은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 으름덩굴과의 상록 덩굴 식물으로, 멸꿀나무라고도 한다. 상기 멸꿀은 암수 한그루로 원줄기는 약 5m 정도 뻗어가고, 잎은 어긋나며 5개 내지 7개의 작은 잎으로 된 손바닥모양 겹잎이다. 작은 잎은 두껍고 달걀모양 또는 타원형이며, 가장자리가 밋밋하다.

[0003] 잎자루는 길이가 6 cm 내지 8 cm 정도이고, 작은 잎자루는 약 3 cm 정도이다. 꽃은 5월에 피고, 황백색이며 총상 꽃차례에 달린다. 암꽃의 작은 꽃가지는 가을에 적갈색으로 되고, 많은 피복이 있어 거칠다. 열매는 장과로 달걀모양 또는 타원형이고 길이가 5 cm 내지 10 cm이며, 10월에 적갈색으로 익고 과육은 으름보다 맛이 좋다. 종자는 달걀모양의 타원형으로 흑색이다. 상기 멸꿀은 주로 한국, 일본, 타이완 또는 중국 등지에 분포한다. 우리나라에서는 주로 전라남도, 경상남도 및 충청남도 등의 남쪽지방의 계곡이나 숲 속에서 잘 생육한다.

[0004] 한편, 현대인들에게 음주는 필요 불가결한 것으로 과도한 음주는 일시적으로 두근거림, 두통, 갈증, 멀미, 위장 장애, 설사 등의 숙취현상(hangover)을 유발한다. 숙취현상 중 두통은 두뇌 혈관의 확장 작용으로 인한 것이며, 갈증과 탈수현상은 에탄올이 뇌하수체에서 분비되는 항이노호르몬인 바소프레신의 분비를 억제함으로써 생기는 에탄올의 이노작용 때문이다. 또한, 위장장애 등의 소화기관 이상은 위산분비의 증가 때문으로, 가장 큰 원인은 간세포에 축적된 에탄올(ethanol)이나 아세트알데히드(acetaldehyde)의 독성 작용에 의한 것이다.

[0005] 이와 같은 에탄올의 분해기작 뿐 아니라 에탄올의 독성학적 연구에 대해서도 다양하게 이루어졌는데, 에탄올의 독성은 신경학적 측면에서 관찰될 뿐만 아니라 유전학적으로도 영향을 끼친다는 보고가 있다(J.Caballeria, et al., Life Sci.,41: 1021-1727, 1986). 최근 들어, 에탄올의 독성을 경감시키거나 독성의 발현을 저해할 수 있는 많은 물질에 대한 연구와 실험이 진행되고 있으며, 그 결과 천연식품이나 한약재료로부터 추출한 성분을 함유한 다양한 건강보조식품이 이와 관련되어 개발되고 있다.

[0006] 따라서 본 발명에서는 우리나라의 전통적인 식물자원을 활용할 목적으로 천연원료인 멸꿀 열매를 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 멸꿀 열매 추출물을 함유하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물을 제

공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 국내공개특허공보 제10-2011-0060002호는 숙취 개선용 조성물에 관한 것으로, 비병원성 미생물을 이용한 후발효차 추출물과 키토올리고당을 적정비율로 포함하여, 숙취의 주원인인 아세트알데하이드를 분해하는 알데하이드 탈수소효소의 활성화에 대한 시너지 효과를 통한, 숙취 개선, 혈중 아세트알데하이드 농도 감소, 간장 보호 및 피로 회복을 위한 숙취 개선용 조성물이 개시되어있다.
- (특허문헌 0002) 국내공개특허공보 제10-2011-0033644호는 혈중 알코올 분해 속도를 촉진시키는 숙취 해소용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 헛개나무, 인진쑥, 쑥, 대열매등글레, 배초향, 영경귀 및 감초의 추출물을 포함한 숙취해소용 조성물에 관한 구성이 개시되어, 각 성분을 적절한 배합비율로 혼합 사용함으로써 각 성분을 개별적으로 사용한 경우와 비교하여 높은 상승작용을 나타내고, 혈중알코올 분해 속도 상승을 포함하여 알코올에 의한 간 손상 및 위염증의 억제효과를 나타낸다.
- (특허문헌 0003) 국내공개특허공보 제10-2010-0119150호는 생약 혼합 추출물을 함유하는 숙취해소용 조성물에 관한 것으로, 율피의 추출물 또는 율피, 연자육 및 지구자의 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로한다. 이로부터 ADH와 ALDH의 활성을 촉진시켜서 알코올과 아세트알데히드의 분해를 촉진하는 효과발휘하여 숙취 해소용 식품, 음료로서 유용하게 사용될 수 있다.
- (특허문헌 0004) 국내등록특허공보 제10-0372561호는 천연 생약제 추출물을 포함하는 숙취해소용 조성물 및 이를 유효성분으로 함유하는 건강보조식품에 관한 것으로, 두충, 홍삼, 결명자 및 황연으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 천연 생약제 추출물 40 ~ 80 중량%, 어성초, 대황, 갈근 및 유자로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 천연 생약제 추출물 5 ~ 40 중량%, 삼백초, 신선초, 감나무열매 및 대추로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 천연 생약제 추출물 5 ~ 40 중량%, 감초, 쑥, 및 녹차로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 천연 생약제 추출물 5 ~ 15 중량%를 포함하는 숙취해소 및 간장 보호효과가 우수한 숙취해소용 조성물 및 이를 유효성분으로 함유하는 건강보조식품에 관한 것이다. 그러나 상기 선행기술들은 본 발명에서 목적으로 하는 멸꿀 열매 추출물을 이용한 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물과는 재료 및 함유 성분에서 차이를 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 우리나라에서 자생하는 천연 자원인 멸꿀 열매 추출물을 원료로 사용함으로써 장기간 복용하여도 부작용 없이 안전하고 혈중알콜농도 저감에 효과적으로 작용하는 고부가가치 조성물의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 멸꿀 열매 조추출물 또는 비극성가용추출물을 유효성분으로 포함하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0010] 멸꿀 열매 조추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 사용하여 추출한 것 일 수 있으며, 추출용매를 사용하여 추출한 멸꿀 열매 조추출물에 비극성가용 용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획한 것일 수 있다.
- [0011] 또한 상기 추출물은 전체 조성물의 0.01 내지 95 중량%의 양으로 포함되어 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료로서 제공될 수 있고, 추출물의 제공량은 체중 kg당 50-200mg의 양으로 제공될 수 있다.
- [0012] 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물의 추출방법은 멸꿀 열매를 증류수로 수세한 다음 증류수와 혼합하여 열수추출하는 단계; 상기 추출물을 여과한 농축하여 동결건조하는 단계; 상기 단계의 추출물을 분획용매에 용해시켜 분획물을 얻어 감압여과 장치로 여과, 농축하여 동결건조하는 단계를 포함하는 추출방법이 제공된다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물은 인체에 부작용이 없으면서 혈중알콜농도 저감 작용이 우수하기 때문에 이를 유효성분으로 함유하는 조성물은 복용이 용이하고 장기간 보관이 가능하여 음주 전, 후의 혈중알콜농도 저감에 유용하게 사용될 수 있다.

[0014]

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 멸균 열매를 나타낸 사진이다.
- 도 2는 멸균 열매 열수 추출물의 추출과 분획 모식도를 나타낸다.
- 도 3는 멸균 열매 열수 추출물에 대한 세포 생존율 측정결과를 나타낸다.
- 도 4은 멸균 열매 열수 추출물(200mg/kg)에 대한 혈중알코올 농도 측정결과를 나타낸다
- 도 5는 멸균 열매 열수 추출물(10, 50, 100, 200mg/kg)에 대한 혈중알코올 농도 측정결과를 나타낸다
- 도 6은 멸균 열매 열수 추출물(50, 100, 200, 400mg/kg)에 대한 혈중 ADH activity 측정결과를 나타낸다.
- 도 7은 멸균 열매 열수 추출물(10, 50, 100, 200mg/kg)에 대한 간 조직 내 ADH activity 측정결과를 나타낸다.
- 도 8은 멸균 열매 열수 추출물(10, 50, 100, 200mg/kg)에 대한 간 조직 내 ALDH activity 측정결과를 나타낸다.
- 도 9는 멸균 열매 열수 추출물에 대한 GOT activity 측정결과를 나타낸다.
- 도 10은 멸균 열매 열수 추출물에 대한 GPT activity 측정결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명에서는 멸균 열매 조추출물 또는 비극성가용 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물이 제공된다. 본 발명자들에 의해 출원되어 공개된 국내 특허출원번호 제10-2011-0082498호에서는 멸균 열매 열수 추출물 0.001중량% 내지 99중량%를 포함하는 간 보호용 조성물을 개시하고 있다. 상기 발명은 멸균 열매 열수추출물을 사용한 부분은 본 발명과 동일하나, 상기 발명에서 사용된 사염화탄소(CC14) 또는 아세트아미노펜(APAP)과 같은 간 독성 약물로 유발된 간 손상에 대한 간 보호 조성물인 점으로 볼 때, 본원 발명은 용도가 혈중알콜농도 저감 촉진용으로 한정되고, 그 작용 메카니즘이 차이를 갖는다.

[0017] 구체적으로는, 사염화탄소(CC14) 또는 아세트아미노펜(APAP)와 같은 간 독성 약물로 유발된 간 손상에 대한 간 보호의 경우, 지질과산화 억제, 혈청 중 GOT, GPT 수치 증가 억제, 사이토크롬 P450의 mRNA 발현량 억제, Nrf-2, HO-1 발현 증가여부를 유효성 평가항목으로 설정하여 실험한다.

[0018] 반면에 본 발명에서와 같이 혈중알콜농도 저감 촉진의 경우, 지질과산화 억제, 혈청 중 GOT, GPT 수치 증가 억제를 포함한 알코올대사의 주요 바이오 마커인 혈중알코올 농도 감소, 알코올탈수소효소 활성(ADH activity), 알데하이드탈수소효소 활성(ALDH activity) 증가여부를 유효성 평가항목로 설정하여 결과를 도출하는 점에서 차이점이 있다. 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다.

[0019] 1. 멸균 열매 열수 추출물 및 분획물 제조

[0020] 도 2는 멸균열매 추출물 및 유기용매에 의한 분획물을 얻는 과정을 나타낸다. 멸균 열매 2.1kg을 증류수로 수세한 다음, 증류수 40L를 가하고, 전기약탕기로 100℃에서 3시간 동안 가열, 추출하였다.

[0021] 추출된 용액은 400 메쉬 여과포로 여과한 다음 감압회전농축기로 농축하였다. 여과 후 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일 과정으로 2번 더 추출, 여과 및 감압 농축한다. 농축된 열수추출물을 동결건조기(Freeze dryer)에서 동결건조 하였다. 멸균 열매 열수추출물 148g(7.05%)을 얻었다.

[0022] 2. 멸균 열매 열수추출물의 극성용매, 비극성용매 가용 분획물의 제조

[0023] 도 2에 도시된 바와 같이 제조된 멸균 열매 열수추출물을 유기 용매를 이용하여 분획물을 제조하였다. 멸균 열매의 극성용매, 비극성용매 가용 분획물의 제조는 멸균 열매 열수 추출물 40g을 증류수 1L에 완전히 용해시킨 후 분획 여두 깔대기에 넣고 헥산(Hexane) 1L를 첨가하여 water층과 hexane 층을 분리하였고 이와 같은 공정을 3번 반복하였다.

- [0024] 동일한 과정을 통해 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻었고, 얻어진 각각의 분획물을 감압여과 장치로 여과하여 농축한 후 동결건조하여 용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다.
- [0025] 2.1. 헥산 가용성 분획 분리
- [0026] 멀꿀 열매 열수 추출물 40g을 1L의 증류수에 완전히 용해시킨 후에 분획 여두 깔대기에 넣고 헥산 1L를 첨가하여 헥산 불용성층(수층)과 헥산가용성층을 분리하였다. 다시 헥산 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 헥산 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.
- [0027] 2.2. 클로로포름 가용성 분획 분리
- [0028] 헥산불용성 분획(수층)에 클로로포름 5L를 가하여 섞은 후에 클로로포름가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 클로로포름 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 클로로포름 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.
- [0029] 2.3. 에틸아세테이트 가용성 분획 분리
- [0030] 클로로포름 불용성 분획(수층)에 에틸아세테이트 5L를 가하여 섞은 후에 에틸아세테이트 가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 에틸아세테이트 불용성층(수층)을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 에틸아세테이트 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.
- [0031] 2.4. 부탄올 가용성 분획 분리
- [0032] 에틸아세테이트 불용성 분획(수층)에 부탄올 5L를 가하여 섞은 후에 부탄올 가용성 분획 및 불용성 분획을 분리하였고, 부탄올 불용성층을 대상으로 동일한 공정을 3번 반복하여 부탄올 불용성 분획 및 가용성 분획을 수집하였다.
- [0033] 2.5 멀꿀열매 열수추출물 및 분획물 수득
- [0034] 멀꿀열매 열수추출물 40g에서 헥산 가용성 분획, 클로로포름 가용성 분획, 에틸아세테이트 가용성 분획 및 부탄올 가용성 분획을 감압 농축한 후에 동결건조하여 헥산분획 0.1g, 클로로포름 분획 0.6 g, 에틸아세테이트 분획 2g, 부탄올 분획 15g을 얻어 시료로 사용하였다.
- [0035] **3. 멀꿀 열매 열수추출물의 세포 독성시험 (by MTT assay)**
- [0036] 멀꿀 열매 열수 추출물의 세포 독성을 측정하기 위하여, 쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 ATCC에서 구입하여 이용하였다. 상기 세포의 배양(Cell culture)에 사용된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F12), FBS(fetal bovine serum), L-글루타민(L-glutamine) 및 페니실린-스트렙토마이신은 Gibco/BRL(USA)에서 구입하였다.
- [0037] 상기 RAW264.7 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙토마이신 및 1% L-글루타민을 첨가한 배양액을 사용하여 배양하였고, 37°C 습윤한 CO₂ 배양기(5% CO₂ /95% air)에서 배양하였다. 상기 세포가 배양접시의 약 80%가 차게 배양시킨 후, PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 세척하고, 0.25% 트립신 및 2.56 mmol/L EDTA를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다.
- [0038] 상기 배양한 세포는, 50,000 cells/well의 밀도로 48 well-plate에 분주하여, 24시간 더 배양하였다. 상기 24시간 경과 후, 아무런 처리를 하지 않고 LPS만 처리한 대조군과 LPS와 상기 실시예 1의 멀꿀 열매 추출물을 세포 생존에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인된 DMSO를 사용하여 다양한 농도로 제조된 멀꿀 열매 추출물을 처리한 실험군으로 나누어, 24시간 동안 더 배양시킨 후, 배양액을 제거하고 MTT 분석(MTT assay) 방법으로 살아있는 세포의 수를 측정하였다.
- [0039] 상기 MTT 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 우선, 세포배양 배지를 제거한 후 MTT를 1 mg/ml로 포함하는 DMEM/F12 배지를 웰 당 1 ml씩 처리하고, 37°C 습윤한 CO₂ 배양기에서 4시간 더 배양하였다. 이후 배지를 제거한 후, tetrazolium bromide salt를 제거하고, DMSO 200 μl를 분주하여 각 웰에 생성된 포르마잔 크리스탈을 용해시키고, 마이크로 플레이트리더(BIO-RAD)에서 540 nm파장으로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다. 상기 멀꿀 열매 추출물로 처리한 결과는 상기 실험을 동일하게 3회 수행하여, 측정된 값의 평균 값으로 도 3에 나타내었다.
- [0040] 상기 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조된 멀꿀 열매 열수 추출물을 다양한 농도, 구체적으로

10 $\mu\text{g/ml}$ 내지 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도별로 처리하고, 24시간을 처리한 경우에도, 아무런 시료를 처리하지 않고 LPS 만 처리한 대조예와 비교한 결과, 상기 실시예 1에서 제조된 멸균 열매 열수 추출물을 다양한 농도로 처리한 경우 모두 세포의 증식에 별다른 영향을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로부터 멸균 열매 열수 추출물은 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0041] **4. 실험 동물사육, 혈청 및 간 조직 분리**

[0042] 멸균 열매 열수추출물의 혈중알콜농도 저감 촉진 효과 측정을 위한 실험동물로서 생후 5주령 된 체중 20-50g 내외의 수컷 ICR mouse를 (주)샘타코(SAMTACO, Korea)부터 구입 하여 동물사육실에서 일정한 조건(온도: $22\pm 2^\circ\text{C}$, 습도: $50\pm 5\%$, 명암: 12시간 light/dark cycle)주기로 일주일간 적응시킨 후 사용하였다.

[0043] 4.1 실험동물 알콜투여에 따른 혈청 및 간 조직 분리

[0044] 실험 그룹(grouping)은 6마리씩 정상군(normal), 대조군(control), 시료 투여군으로 나누었다. 간 조직 내 ADH activity, ALDH activity 측정을 위해 실험그룹(grouping)은 2 배치로 하였다. 실험에 앞서 사료 섭취로 인해 나타날 수 있는 위장관을 통한 알코올의 흡수 방해 현상을 배제하기 위해 18시간 동안 절식시켰으며 이때 물은 제한없이 공급하였다.

[0045] 각 시료는 알코올 투여 30분전에 경구적으로 10 ml/kg씩 투여하였으며, 알코올 투여는 25% 주정을 체중 kg당 3g 수준으로 1회 경구 투여하였다. 대조군은 시료 대신 증류수를 경구 투여하였고 정상군은 아무런 조건도 주지 않았다. 혈중 알코올 농도 측정을 위한 채혈은 알코올 투여 후 diethyl ether 마취상태에서 0.5시간, 1시간, 2시간 그리고 4시간 후에 각각 채혈을 하였다. 채혈한 일부 혈액은 얼음(ice)에 방치시킨 후 12,000xg에서 5분간 원심분리하여 혈중 알코올 농도 측정에 사용하였고, 일부 혈액은 4도씨에서 2시간 방치한 후 600xg에서 15분간 원심분리하여 혈청 ADH activity 측정에 각각 사용하였다. 또한 적출한 간은 간 조직 내 ADH activity, ALDH activity를 측정하는데에 각각 사용하였다.

[0046] **5. 멸균 열매 열수추출물(200mg/kg)에 대한 혈중 알코올 농도 측정 실험**

[0047] 혈중 알코올 농도는 EtOH assay kit (biovision, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈액에서 분리된 혈청 5ul를 EtOH assay buffer로 1:10으로 묽힌 다음, reaction mixture 50ul와 혼합하였다. 실온, 암실에서 30분 동안 방치한 다음, 570nm에서 흡광도를 측정하였고, 에탄올을 처리한 대조군의 흡광도 값을 기준으로 멸균 열매 열수 추출물(200mg/kg) 처리 군의 혈중 알코올 농도 값을 비교하였다.

[0048] 멸균 열매 열수 추출물을 에탄올을 투여하기 30분 전에 경구투여하고, 에탄올을 투여한 후 30분, 1시간, 2시간 그리고 4시간마다 혈액을 채취하여 혈중 알코올 농도를 측정한 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 에탄올만 처리한 대조군에 비해 멸균열매 열수 추출물(200mg/kg)을 투여한 군에서 혈중 알코올 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0049] 이로부터 멸균 열매 열수 추출물을 실험동물의 체중대비 일정한 비율로 투여함으로써 자연 생산물에 의한 혈중 알코올 농도 감소 기능을 갖는 것이 확인됨으로서 본 발명에 따른 조성물은 알코올 섭취에 의하여 야기되는 혈중알콜농도 저감 촉진에 사용할 수 있다.

[0050] **5-1. 멸균 열매 열수추출물(10, 50, 100, 200mg/kg)에 대한 혈중 알코올 농도 측정 실험**

[0051] 혈중 알코올 농도는 EtOH assay kit (biovision, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈액에서 분리된 혈청 5ul를 EtOH assay buffer로 1:10으로 묽힌 다음, reaction mixture 50ul와 혼합하였다. 실온, 암실에서 30분 동안 반응시킨 다음, 570nm에서 흡광도를 측정하였고, 대조군인 에탄올 처리군의 값과 비교하여 혈중알코올 농도를 계산하였다.

[0052] 멸균 열매 열수 추출물(10, 50, 100, 200mg/kg)을 에탄올을 투여하기 30분 전에 경구투여하고, 에탄올을 투여한 후 30분, 1시간, 2시간 그리고 4시간마다 혈액을 채취하여 혈중 알코올 농도를 측정한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 에탄올만 처리한 대조군에 비해 멸균열매 열수 추출물(10, 50, 100, 200mg/kg)을 투여한 군에서 혈중 알코올 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 1시간대에서부터 현저하게(50% 이상) 혈중 알코올 농도가 감소하는 것을 확인하였다.

[0053] 이로부터 멸균 열매 열수 추출물을 실험동물의 체중대비 일정한 비율로 투여함으로써 자연 생산물에 의한 혈중 알코올 농도 감소 기능을 통해 의해 알코올에 의한 혈중알콜농도 저감 효과를 갖는 것이 확인됨으로서 본 발명에 따른 조성물은 알코올 섭취에 의하여 야기되는 혈중알콜농도 저감 촉진에 사용할 수 있다.

[0054] 6. 멸균 열매 열수추출물에 대한 혈중 ADH activity 측정 실험

[0055] 상기 알콜 실험을 실시한 쥐를 알코올 투여 후 2시간 대에 채혈한 후, 4도씨에서 2시간 방치한 후 600xg에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 분리된 혈청은 ADH assay buffer, developer, 조효소인 NAD⁺와 혼합한 뒤 37도씨에서 10분 간격으로 30분 동안 반응하여 생성되는 NADH의 양을 흡광도 450nm에서 측정하였으며(ADH activity colorimetric assay kit, #787-100; BioVision), 활성도 단위는 단백질 1mg이 1분간 생성한 NADH의 양을 nmole로 표시하고 그래프 산출은 대조군(에탄올 처리군) 값에 대한 상대값(relative, %)으로 표기하였다.

[0056] 혈중 ADH activity활성을 측정한 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 에탄올만 처리한 대조군에 비해 멸균 열매 열수 추출물(50, 100, 200, 그리고 400mg/kg)을 투여한 군에서 농도 의존적으로 ADH activity가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0057] 특히, 멸균 열매 열수 추출물 200mg/kg, 400mg/kg을 투여한 실험군의 경우, ADH activity가 알코올만 투여한 대조군(100%)에 비해 각각 268.9%(200mg/kg), 260.5%(400mg/kg) 증가 효과를 확인하였고, 양성대조군 YM투여군(200mg / kg (145.6%), 400mg / kg(230.1))보다 높은 활성을 보임을 확인하였다.

[0058] 이로부터 멸균 열매 열수추출물은 실험동물의 체중대비 일정한 비율로 투여함으로써 자연 생산물에 의한 알코올 분해효소 활성증가에 관여함으로써 알코올 분해에 의한 혈중알코올농도 저감 촉진 효과를 갖는 것이 확인됨으로서 본 발명에 따른 조성물은 알코올 섭취 의하여 야기되는 혈중알코올농도 저감 촉진용으로 사용할 수 있다.

[0059] 7. 멸균 열매 열수추출물에 대한 간 조직 내 ADH activity 측정 실험

[0060] 상기 알콜 실험을 실시한 쥐를 알코올 투여 후 2시간 대에 대퇴부 동맥에서 채혈 후(2h) 즉시 간을 적출하여 0.25M sucrose를 섞어 4도씨에서 homogenizer를 이용해 균질화하고. 이것을 600xg에서 15분간 원심분리를 하여 핵 및 미마체 부분을 제거한 상층액을 얻고, 다시 10,000g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻었다. 그 후 130,000g에서 45분간 초고속 원심분리를 통해 간의 cytosol부분을 분리한 다음 ADH assay buffer, developer, 조효소인 NAD⁺와 혼합한 뒤 37℃에서 10분 간격으로 30분 동안 반응하여 생성되는 NADH의 양을 흡광도 450nm에서 측정하였으며(ADH activity colorimetric assay kit, #787-100; BioVision), 활성도 단위는 단백질 1mg이 1분간 생성한 NADH의 양을 nmole로 표시하고 그래프 산출은 대조군(에탄올 처리군) 값에 대한 상대값(relative, %)으로 표기하였다.

[0061] 간 조직 중 ADH activity활성을 측정한 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 에탄올만 처리한 대조군에 비해 멸균 열매 열수 추출물(10, 50, 100, 그리고 200mg/kg)을 투여한 군에서 농도 의존적으로 ADH activity가 증가하는 것을 확인하였다..

[0062] 멸균 열매 열수 추출물 10mg/kg, 50mg/kg을 투여한 실험군의 경우, ADH activity가 알코올만 투여한 대조군(65.9%)과 비교했을 때 각각 92.5%(10mg/kg), 89.5%(50mg/kg) 로, ADH activity (활성)이 증가하여 정상군(100%)에 근접하게 회복하는 것을 확인하였다.

[0063] 특히, 멸균 열매 열수 추출물 100mg/kg, 200mg/kg을 투여한 실험군의 경우, ADH activity가 알코올만 투여한 대조군(100%)에 비해 각각 168.7%(100mg/kg), 181.5%(200mg/kg) 증가 하는 효과를 확인하였다.

[0064] 이로부터 멸균 열매 열수추출물은 실험동물의 체중대비 일정한 비율로 투여함으로써 자연 생산물에 의한 알코올 분해효소 활성증가에 관여함으로써 알코올 분해에 의한 혈중알코올농도 저감 촉진 효과를 갖는 것이 확인됨으로서 본 발명에 따른 조성물은 알코올 섭취 의하여 야기되는 혈중알코올농도 저감 촉진 및 해소에 사용할 수 있다.

[0065] 8. 멸균 열매 열수추출물에 대한 간 조직 내 ALDH activity 측정 실험

[0066] 상기 알콜 실험을 실시한 쥐를 대퇴부 동맥에서 마지막 채혈 후(4h) 즉시 간을 적출하여 0.25M sucrose를 섞어 4℃에서 homogenizer를 이용해 균질화하고. 이것을 600xg에서 15분간 원심분리를 하여 핵 및 미마체 부분을 제거한 상층액을 얻고, 다시 10,000g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 분리된 상층액은 ALDH assay buffer, developer, 조효소인 NAD⁺와 혼합한 뒤 37℃에서 10분 간격으로 30분 동안 반응하여 생성되는 NADH의 양을 흡광도 450nm에서 측정하였으며(ALDH activity colorimetric assay kit, #731-100; BioVision), 활성도 단위는 단백질 1mg이 1분간 생성한 NADH의 양을 nmole로 표시하고 그래프 산출은 대조군(에탄올 처리군) 값에 대한 상대값(relative, %)으로 표기하였다.

[0067] 간 조직 중 ALDH activity 활성을 측정한 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 에탄올만 처리한 대조군에 비해 멸균 열매 열수 추출물(10, 50, 100, 그리고 200mg/kg)을 투여한 군에서 농도 의존적으로 ALDH activity가 증가하는

것을 확인할 수 있었다.

[0068] 구체적으로, 멸균 열매 열수 추출물 10mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg을 투여한 실험군의 경우, ALDH activity가 알코올만 투여한 대조군(70.9%)에 비해 각각 91.1%(10mg/kg), 97.3%(50mg/kg), 99.7%(100mg/kg), 106.7%(200mg/kg)로, ALDH activity (활성)이 정상군(100%)에 근접하게 회복하는 것을 확인하였다.

[0069] 특히, 멸균 열매 열수 추출물을 투여한 실험군의 경우, ALDH activity가 알코올만 투여한 대조군(100%)과 비교했을 때 각각 120.5%(10mg/kg), 137.2%(50mg/kg), 140.6%(100mg/kg), 150.5%(200mg/kg)로 농도 의존적으로 현저하게 증가 하는 효과를 확인하였다.

[0070] 이로부터 멸균 열매 열수추출물은 실험동물의 체중대비 일정한 비율로 투여함으로써 자연 생산물에 의한 알데히드 분해효소 활성증가에 관여함으로써 간 조직 내 독소인 알데히드(aldehyde) 분해에 의한 혈중알콜농도 저감 촉진 효과를 갖는 것이 확인됨으로서 본 발명에 따른 조성물은 알코올 섭취 의하여 야기되는 혈중알콜농도 저감 촉진 및 해소에 사용할 수 있다.

[0071] **7. 멸균 열매 열수추출물에 대한 GOT/GPT 측정 실험**

[0072] 도 9는 멸균 열매 열수 추출물에 대한 알코올을 투여한 생쥐의 혈청 중 GOT 활성도 측정결과를 나타내며, 도 10은 멸균 열매 열수 추출물에 대한 알코올을 투여한 생쥐의 혈청 중 GPT 활성도 측정결과를 나타낸다. 마취된 mouse의 복부대동맥으로부터 채혈을 실시하였으며, 채혈된 혈액은 3,000rpm에서 5min동안 원심분리하여 혈청을 얻었다.

[0073] 분리된 혈청 중 transaminase(GOT, GPT)의 활성도 측정을 위해서 사용한 기질은 GOT의 경우 L-aspartic acid와 a-ketoglutaric acid, GPT의 경우 L-alanine과 a-ketoglutaric acid이다. 이들 기질을 사용하여 37℃에서 39분간 반응시킬 때 생성되는 pyruvic acid가 알칼리성 하에서 2,4-dinitrophenyl hydrazine과 작용하여 발색되는 hydrazine의 비색을 정량하는 Reitman-Frankel 법에 의해 조제된 진단용 kit(아산제약, 한국)를 사용하여 505nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0074] 활성도의 단위는 혈청ml당 Karmen unit로 표시하였다. 도 9과 10에 나타난 것처럼 멸균열매 열수추출물을 50, 100, 200mg/kg 농도로 투여한 결과, 알코올만 투여한 대조군과 비교했을 때 GOT, GPT 상승억제효과가 있는 것으로 나타났다.

[0075] 따라서, 멸균 열매 열수추출물은 간 손상에 영향을 주지 않으며, 알코올 섭취로 인한 GOT, GPT 활성 상승을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0076] **8. 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물을 유효성분으로 하는 음료의 효과**

[0077] 음료 한 병당 상기 실시예에서 제조된 혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물 12g과 정제수 100ml를 혼합하여 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료를 제조하였다. 실험 대상자에게 소주 한 잔에 새우깡 5조각을 먹도록 하여 총 소주 300ml를 20분 동안 음용하도록 하였다. 10분 후, 상기에서 제조한 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료를 음용하도록 하였다. 대조구로는 100ml의 정제수를 마시도록 하였다. 이후, 음주 직후부터 30분 간격으로 120분까지 음주측정기를 이용하여 혈중 알코올 농도를 측정하였다. 이때 혈중 알코올 농도는 음주 직후의 알코올 농도를 100으로 하여 잔존하는 알코올 농도를 %로 나타내었다.

표 1

[0078] 본 발명의 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료 복용 후 혈중 알코올 잔존을 측정 결과

	음주 직후	30분 후	60분 후	90분 후	120분 후
본 발명에 따른 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료	100%	81%	70%	61%	49%
대조구	100%	85%	78%	70%	65%

[0079] 그 결과, 하기 표 1에 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료 복용시 대조군에 비해 혈중 알코올 농도가 감소함을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 실험과 동일한 방법에 따라 건강한 20세 이상의 성인 남녀 10명(연령 23±5)에게 혈중알콜농도 저감 촉진 효과, 소화 효과 및 두통 감소 효과에 대한 임상 설문 조사를 실시한 결과, 본 발명에 따른 혈중알콜농도 저감 촉진용 음료를 복용한 경우, 대조구에 비해 혈중알콜농도 저감 촉진 및 해소 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

산업상 이용가능성

[0080]

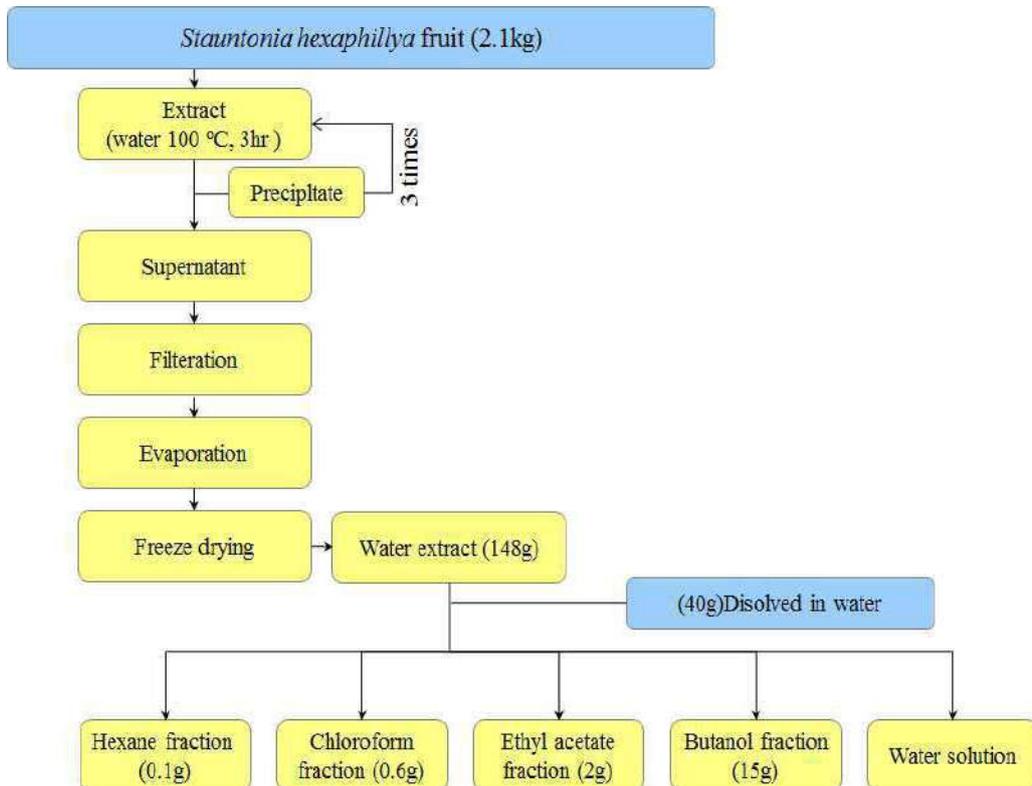
혈중알콜농도 저감 촉진용 조성물로서 멀꿀열매 추출물은 인체에 부작용이 없으면서 혈중알콜농도 저감 촉진 작용이 우수하기 때문에 이를 유효성분으로 함유하는 건강보조식품은 복용이 용이하고 장기간 보관이 가능하여 음주 전, 후의 혈중알콜농도 저감 촉진에 유용하게 사용될 수 있고, 혈중알콜농도 저감 촉진용 원료를 자연에서 식하는 식물로 대체함으로 제조생산단가 절감과 산업화를 통한 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있을 것이다.

도면

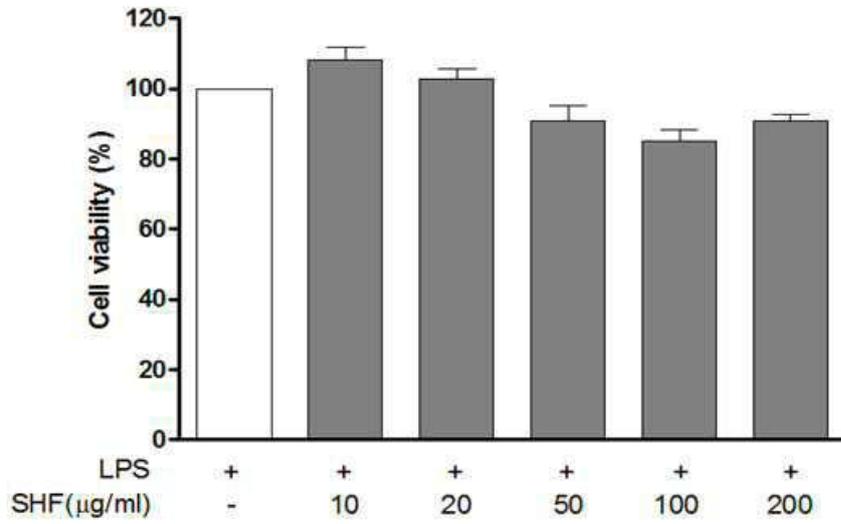
도면1



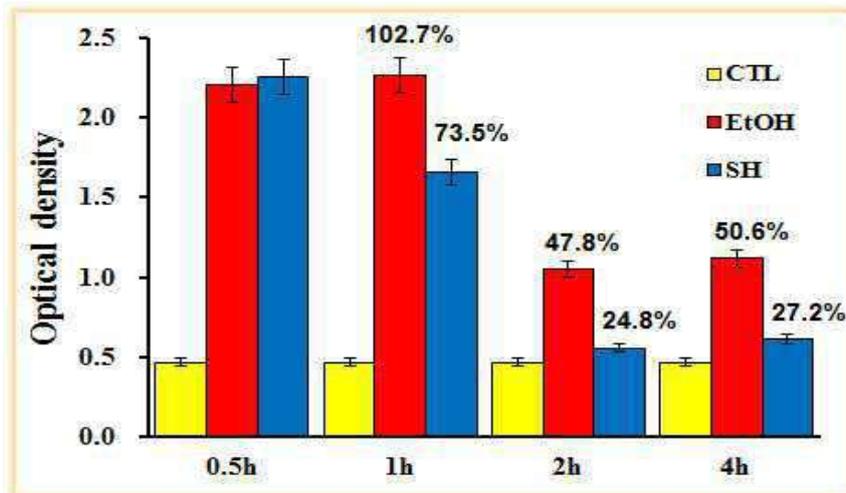
도면2



도면3

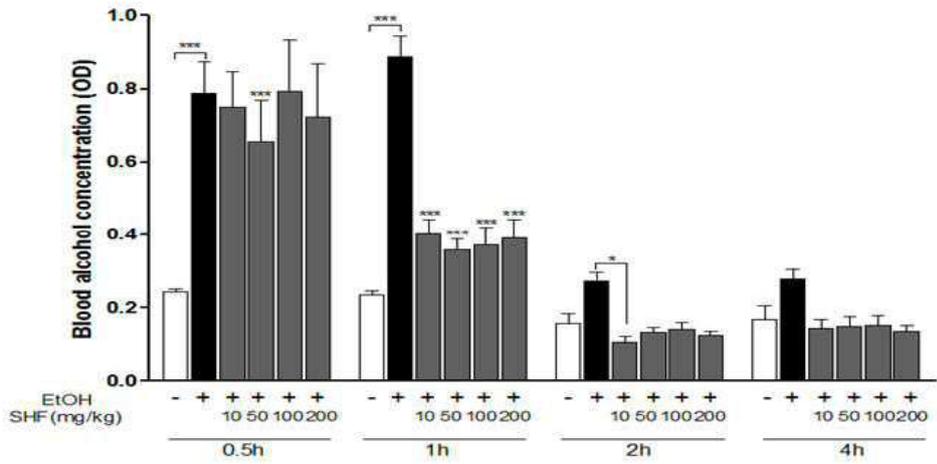


도면4

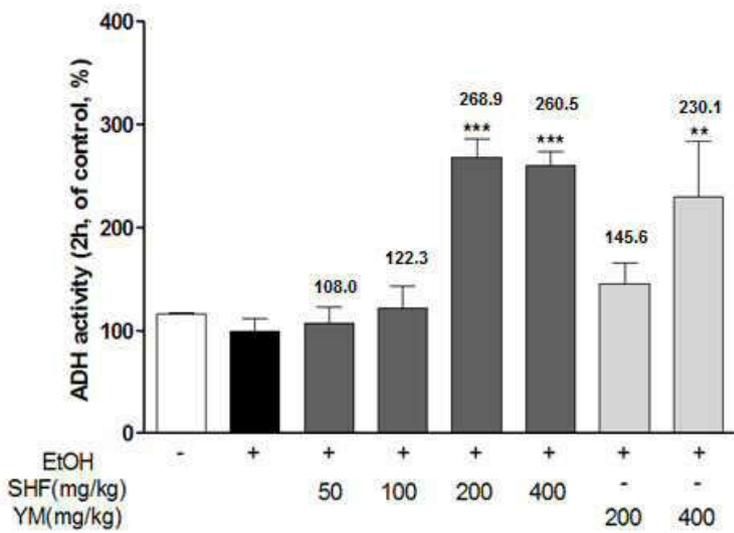


SH: 멀꿀 열매 열수 추출물(200mg/kg)
 (% : percentage of alcohol in blood)

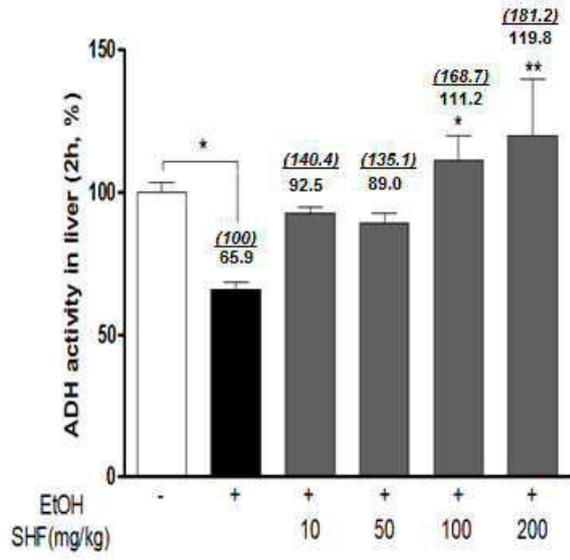
도면5



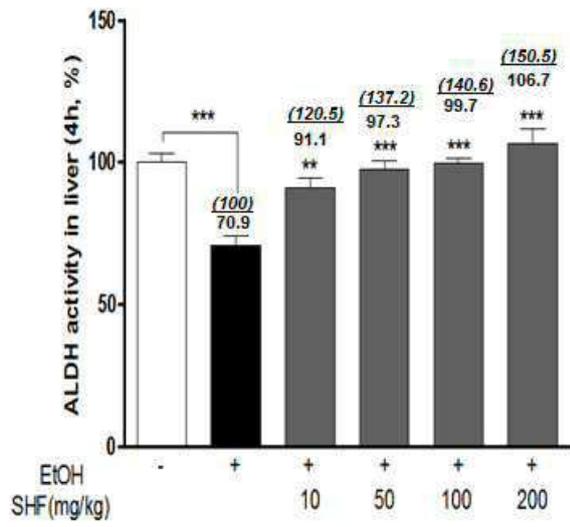
도면6



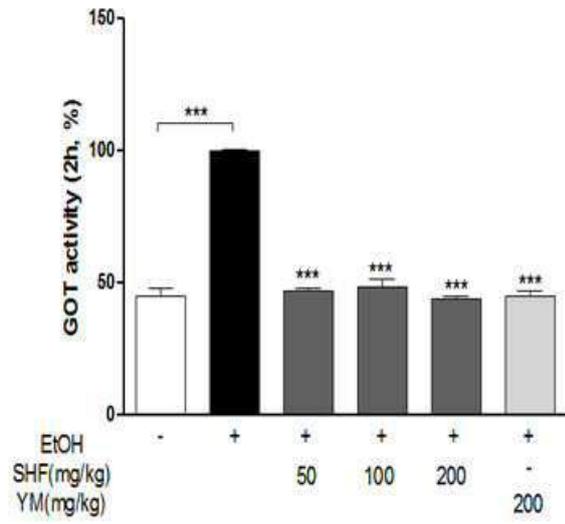
도면7



도면8



도면9



도면10

