



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0033338
(43) 공개일자 2011년03월31일

(51) Int. Cl.

A61K 36/8962 (2006.01) *A61P 25/24* (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01) *A61K 36/70* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0090787

(22) 출원일자 2009년09월25일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

류중훈

서울 강남구 대치동 511 (24/3) 한보미도맨션 101-609

이승주

서울특별시 동대문구 이문2동 334-97 1F1

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

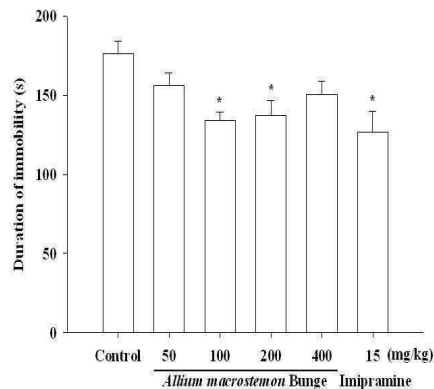
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 해백 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 해백 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 해백 추출물은 생쥐의 강제수영법(Fore swimming test) 및 수동회피실험법으로 항우울증 효과를 확인한 결과, 기존의 우울증 치료제에 비하여 강력하게 우울증을 억제하고, 해마의 치이랑에서의 세포 분화를 증가시키는바, 우울증의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김동현

서울특별시 용산구 갈월동 고려에이트리움 1601호

박동현

경상북도 안동시 용상동 971-1 경동아파트 301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 no. 10524

부처명 서울시정개발연구원 부설 산학연지원센터

연구관리전문기관

연구사업명 노인성 질환계 천연물 신약 클러스터조성 사업

연구과제명 천연물 소재 항우울제 KHUR-4X의 상용화

기여율

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2008년 12월 01일 ~ 2009년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

해백 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 정제수를 포함한 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물을 포함하는 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 해백 추출물은 추가적으로 하수오, 총백 및 이들의 조합의 열수 추출물 또는 유기용매 추출물을 혼합하여 사용 가능한 약학조성물.

청구항 4

해백 증량의 약 1 내지 100배(v/w)의 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매를 가하여 30 내지 110 ℃에서 1시간 내지 5시간동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각추출, 가열추출의 추출방법으로 추출한 후, 여과하고 감압농축 및 건조하는 공정을 포함하는 해백 추출물의 제조방법.

청구항 5

해백 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 해백 추출물은 추가적으로 하수오, 총백 및 이들의 조합의 열수 추출물 또는 유기용매 추출물을 혼합하여 사용 가능한 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해백 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] [문헌 1] P.E. Greenberg, et al., The economic burden of depression in 1990, J Clin Psychiatry, 54, pp.405-418, 1993

[0003] [문헌 2] A.H. Clayton, et al., Prevalence of sexual dysfunction among newer antidepressants, J Clin Psychiatry, 63, pp.357-366, 2002

[0004] [문헌 3] J. Peng, et al., Novel furostanol glycosides from Allium macrostemon, Planta Med, 61, pp.58-

61, 1995

- [0005] [문헌 4] R.D. Porsolt, et al., Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants, Arch Int Pharmacodyn Ther, 229, pp.327-336, 1977
- [0006] [문헌 5] D.H. Kim, et al., The ameliorating effect of oroxylin A on scopolamine-induced memory impairment in mice, Neurobiol Learn Mem, 87, pp.536-546, 2007
- [0007] [문헌 6] G. Kronenberg, et al., Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli, J Comp Neurol, 467, pp.455-463, 2003
- [0008] [문헌 7] D.H. Kim, et al., Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion-induced memory impairment in mice, Pharmacol Biochem Behav, 85, pp.658-668, 2006

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0009] 우울증(주요우울장애)은 가장 많은 정신질환의 하나이며, 전 국민의 평생 유병률이 15%에 해당하고, 미국과 유럽에서는 심장질환 다음으로 국민의 생활에 지장을 많이 미치는 질환으로 보고되고 있다. 한국에서도 같은 상황으로 인식되어 우울증의 중요성에 대한 인식이 점점 증가되는 상황인데, 우울증은 신체질환에서 흔히 동반되며, 우울증이 동반되는 경우에 신체질환의 증상이 보다 심하게 나타나고, 예후가 나빠지며, 치료비용이 높아지는 등 국민생활에 많은 영향을 미친다.
- [0010] Greenberg 등(P.E. Greenberg, et al., The economic burden of depression in 1990, J Clin Psychiatry, 54, pp.405-418, 1993)이 미국에서 조사한 연구에서는 우울장애로 인하여 직장에 결근함으로써 발생한 경제적 부담이 170억불에 이르는 것으로 보고 하였다. 이러한 맥락에서 세계은행의 요청으로 1992년부터 세계보건기구와 하버드 의대가 공동으로 세계적으로 107개 주요질환이 인구에 미치는 부담(Global Burden of Disease)인 사망률과 장애도를 조사한 바, 우울증의 1990년 장애도 순위는 전 세계적으로 전체연령의 인구에서 4위, 2020년에는 2위로 조사되었으며, 15세-44세의 생산성이 가장 높은 연령에서는 1위로 조사되어 우울증이 인류의 생활에 주요장애 질환으로 인식되었다.
- [0011] 현대적인 항우울제의 발달은 결핵약으로 개발된 이프로니아지드(iproniazid)가 단가아민 산화효소 억제제(MAOIs)이며, 항우울효과가 있음이 발견되면서부터이다. MAOIs들의 발전은 이프로니아지드의 개발 후 페넬라인(phenelzine)과 트라닐사이프라민(tranlylcypromine), 모클로베마이드(moclobemide)를 포함하여 10여 종류 이상이 개발되었다. 한편, 항정신병약물인 클로르프로마진(chlorpromazine)이 1950초 항히스타민제로 개발되어 정신분열병 치료에 효과가 있음이 증명되고, 이와 유사하게 1955년 스위스의 Geigy Drug Co.에서 항히스타민제로 개발된 이미프라민(imipramine)이 합성되면서부터 항우울 약물의 개발이 활성화되었다. 이미프라민도 정신분열병에의 효과를 연구하던 중 환각이나 망상에 효과가 거의 없다는 것이 곧 알려졌으나 정신병적 증상과 우울증이 같이 있는 환자에서 우울증을 완화시킨다는 것이 발견되었다. 이 발견은 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressants; TCAs)의 발전을 가져왔고, 삼환 구조를 변형한 아미트리프틸린(amitriptyline)이나 데시프라민(desipramine) 등의 많은 부가적인 TCAs들이 생산되었다. 이후 2세대와 3세대 항우울제가 개발되었는데 1980년대 초 구조 및 효능이 비슷한 마프로틸린(maprotiline)과 아목사핀(amoxapine) 같은 사환계 합성물(tetracyclic compounds)이 판매되었고 헤테로사이클릭스(heterocyclics)라 불리기도 했다. 그러나 1980년대 세로토닌 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitors; SSRIs)인 prozac이 소개되기 이전의 약물은 효과는 좋으나, 그 부작용으로 항콜린작용인 구갈, 변비, 배뇨곤란, 시력장애, 발기부전 등이 나타나고, 심혈관계에 대한 작용으로 혈압, 맥박, 심장전도(cardiac conduction) 등에 상당한 영향을 미치며, α1-adrenergic 수용체의 차단으로 인한 기립성 저혈압이 나타나고, 항히스타민 효과로 진정작용이 나타난다. 또한 성기능 장애로 성욕감퇴, 발기부전, 사정장애, 쾌감결여 등이 부작용으로 나타나며, 체중증가, 신경학적 부작용으로 진전(tremor)이 나타나 약물에 대한 순응도를 떨어뜨리고 환자들의 삶의 질에 영향을 끼쳤다. 이러한 부작용으로 최근에는 부작용이 적고 효과도 좋은 새로운 항우울제인 선택적인 단가아민 재흡수 차단제가 소개되고 이외에 여러 작용기전의 항우울제가 나타나면서 널리 임상에서 사용되고 있다. 뿐만 아니라 새로운 항우울 치료약물은 항우울 효능은 물론 성기능 등의 부작용 없이 기억력 증강 작용이 있어야 할 것으로 제안되고 있다(A.H. Clayton, et al., Prevalence of sexual dysfunction among newer antidepressants, J Clin Psychiatry, 63, pp.357-366, 2002).

[0012] 해백은 부추과에 속하는 돌달래(*Allium macrostemon* Bunge.)의 비늘줄기를 사용하는 생약으로, 한방적으로 건위, 발한, 이뇨, 거담, 정장, 살균, 구충약, 지혈, 전염성 위장염, 동맥경화증, 고혈압, 소화불량, 종기, 욕, 황달, 관절염 등의 목적으로 사용되어 왔으며, 지금까지 마크로스테모노사이드(macrostemonoside)와 같은 사포닌 등의 성분이 분리되었다(J. Peng, et al., Novel furostanol glycosides from *Allium macrostemon*, *Planta Med*, 61, pp.58-61, 1995)

[0013] 이에 본 발명자들은 천연물로부터 새로운 항우울 약물을 개발하기 위하여 수백종의 천연물을 검색한 결과, 해백 추출물이 항우울증 약효의 생체 내(in vivo) 검색법인 생쥐 강제수영법(Fore swimming test)에서 농도의존적으로 부동 시간(immobility duration)을 현저히 감소시켰으며, 수동회피실험법에서 기억력 증강 효과를 나타내었고, 해마의 치아랑에서의 세포 분화를 증가시킴을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

[0014] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 해백 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 해백 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0016] 본원에서 정의되는 상기 추출물은 정제수를 포함한 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 95% 에탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[0017] 본원에서 정의되는 해백 추출물은 추가적으로 하수오, 총백 및 이들의 조합의 열수 추출물 또는 유기용매 추출물을 혼합하여 사용 가능하다.

[0018] 이하, 본 발명의 해백 추출물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.

[0019] 해백 중량의 약 1 내지 100배(v/w), 바람직하게는 약 5 내지 20배(v/w)의 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 95% 에탄올을 가하여 30 내지 110℃, 바람직하게는 50 내지 100℃에서 1시간 내지 5시간, 바람직하게는 2시간동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각추출, 가열추출 등의 추출방법, 바람직하게는 열수추출 또는 환류냉각추출법으로 추출한 후, 여과하고 감압농축 및 건조하여 본 발명의 추출물을 수득할 수 있다.

[0020] 본 발명은 해백 중량의 약 1 내지 100배(v/w), 바람직하게는 약 5 내지 20배(v/w)의 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 95% 에탄올을 가하여 30 내지 110℃, 바람직하게는 50 내지 100℃에서 1시간 내지 5시간, 바람직하게는 2시간동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각추출, 가열추출 등의 추출방법, 바람직하게는 열수추출 또는 환류냉각추출법으로 추출한 후, 여과하고 감압농축 및 건조하는 공정을 포함하는 해백 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0021] 본 발명은 상기의 제조방법으로 얻어진 해백 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 추출물을 함유하는 약학조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 50 중량%로 포함한다.

[0023] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.

[0024] 본 발명의 추출물 자체는 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0025] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등

의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 추출물을 포함하는 조성물에 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, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 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 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 혼수, 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 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.5 g/kg 내지 5 g/kg으로, 바람직하게는 1 g/kg 내지 3 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기의 제조방법으로 얻어진 해백 추출물을 유효성분으로 함유하는 우울증의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0030] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 우울증의 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, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명의 추출물은 우울증의 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 1 내지 5 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.

[0032] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료서 상이 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, 슈지 스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시줄 텍스트린 등성물은 지통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 는 비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A함유할 시르히진 등) 및 합 비향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율 지본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0033] 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 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.

효 과

- [0034] 본 발명의 해백 추출물은 생쥐의 강제수영법(Fored swimming test) 및 수동회피실험법으로 항우울증 효과를 확인한 결과, 기존의 우울증 치료제에 비하여 강력하게 우울증을 억제하고, 해마의 치이랑에서의 세포 분화를 증가시키는바, 인체에 무해한 우울증의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품에 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 본 발명을 참고예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0036] 단, 하기 참고예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예, 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1. 해백 열수 추출물의 제조

- [0038] 경동시장(Seoul, Korea)에서 구입한 해백 126.74 g에 10배(v/w)의 증류수를 가하여 환류 냉각장치(pyrex, CD1100-300)에서 80~100℃로 2시간동안 추출하였다. 추출이 완료된 후, Whatman (No. 1) 여과지(filter paper)로 여과하고, 감압농축 및 동결건조(Eyela, model FDU-2000, Japan)하여 해백 열수 추출물 33.35 g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “AM-W” 라 명명함.).

[0039] 실시예 2. 해백 95% 에탄올 추출물의 제조

- [0040] 경동시장(Seoul, Korea)에서 구입한 해백 200 g에 10배(v/w)의 95% 에탄올 수용액을 가하여 환류 냉각장치(pyrex, CD1100-300)에서 60℃로 2시간동안 2회 추출하였다. 추출이 완료된 후, Whatman (No. 1) 여과지(filter paper)로 여과하고, 감압농축 및 동결건조(Eyela, model FDU-2000, Japan)하여 해백 95% 에탄올 추출물 4.56 g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “AM-95E” 라 명명함.).

[0041] 실시예 3. 하수오 95% 에탄올 추출물의 제조

- [0042] 경동시장(Seoul, Korea)에서 구입한 하수오(*Polygonum multiflorum* Thunberg) 50 g에 10배(v/w)의 95% 에탄올 수용액을 가하여 환류 냉각장치(pyrex, CD1100-300)에서 60℃로 2시간동안 2회 추출하였다. 추출이 완료된 후, Whatman (No. 1) 여과지(filter paper)로 여과하고, 감압농축 및 동결건조(Eyela, model FDU-2000, Japan)하여 하수오 95% 에탄올 추출물 4.8 g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “PM-95E” 라 명명함.).

[0043] 실시예 4. 총백 열수 추출물의 제조

- [0044] 경동시장(Seoul, Korea)에서 구입한 총백(*Allium fistulosum* Linne) 100 g에 10배(v/w)의 증류수를 가하여 환류 냉각장치(pyrex, CD1100-300)에서 80~100℃로 2시간동안 추출하였다. 추출이 완료된 후, Whatman (No. 1) 여과지(filter paper)로 여과하고, 감압농축 및 동결건조(Eyela, model FDU-2000, Japan)하여 총백 열수 추출물 29.8 g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “AF-W” 라 명명함.).

[0045] 참고예 1. 실험동물의 준비

- [0046] 5주령의 ICR 생쥐 (23 - 25 g)를 (주) 오리엔트 (Seoul, Korea)에서 공급받아 경희대학교 약학대학의 clean cage에 약 5일간 적응시켜 사용하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 온도 (23 ± 2 ℃), 습도 (55 ± 10 %) 및 명암주기 (12 시간)는 자동으로 조절되도록 하였다.

[0047] **참고예 2. 통계처리**

[0048] 모든 실험 결과는 일원변량 분석을 이용하여 통계 처리하였고, 유의성이 인정될 경우 Student-Newman-Keuls Test를 사용하여 $p < 0.05$ 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0049] **실험예 1. 강제수영법에 의한 항우울 활성 확인**

[0050] 강제수영법에 의한 해백 추출물의 항우울 활성을 측정하기 위하여, 문헌에 기재된 포설트(Porsolt) 등의 방법을 이용하여 하기와 같이 실험하였다(R.D. Porsolt, et al., Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants, Arch Int Pharmacodyn Ther, 229, pp.327-336, 1977).

[0051] 강제수영을 하는 생쥐는 활동과 부동자세(Immobility duration)를 교대로 보이는데, 항우울제는 용량 의존적으로 부동자세를 보이는 시간(부동시간)을 감소시키므로, 부동시간을 측정함으로써 항우울 활성을 확인하였다.

[0052] 실시예에서 수득한 해백 열수 추출물(AM-W) 및 95% 에탄올 추출물(AM-95E)을 각각 14일 간 경구로 투여하고, 14일째 투약 1시간 경과 후 소음이 차단된 방에서 지름 14 cm, 높이 25 cm의 실린더에 20 cm까지 물(23-26 °C)을 채운 후, 각 군당 10마리씩 하여, 실린더에 생쥐를 넣고 6분 동안 강제수영법을 시행하여 나중 4분의 부동자세를 보이는 시간을 측정하였다. 강제수영법을 이용한 항우울 활성의 측정 시, 대조군은 약물 대신 생리 식염수를 투여하였으며, 양성대조군은 이미프라민(imipramine, 15 mg/kg, Sigma-Aldrich Chemistry)을 투여한 실험군의 부동시간을 측정하였다.

[0053] 또한, 실시예 3에서 수득한 하수오 95% 에탄올 추출물(PM-95E) 및 실시예 4에서 수득한 총백 열수 추출물(AF-W)을 각각 14일 간 경구로 투여한 후, 상기 실험방법으로 부동시간을 측정하였다.

[0054] 해백의 항우울 효과에 대한 용량 의존적 실험을 실시한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 해백 열수 추출물(AM-W)의 100 및 200 mg/kg의 용량에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 부동시간의 감소(각각 23.8% 및 22.2%)를 확인할 수 있었으며, 이는 양성대조군으로 사용한 이미프라민(Sigma-Aldrich Chemistry) (28.1%)과 거의 동등한 효능임을 확인할 수 있었다.

[0055] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 해백 95% 에탄올 추출물(AM-95E)의 0.5 및 1 mg/kg의 용량에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 부동시간의 감소(각각 22.3% 및 15.6%)를 확인할 수 있었으며, 이는 양성대조군으로 사용한 이미프라민(Sigma-Aldrich Chemistry) (26.0%)과 거의 동등한 효능임을 확인할 수 있었다.

[0056] 도 3에 나타난 바와 같이, 하수오 95% 에탄올 추출물의 50 mg/kg의 용량에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 부동시간의 감소(17.0%)를 확인할 수 있었으며, 이는 양성대조군으로 사용한 이미프라민(Sigma-Aldrich Chemistry) (20.1%)과 거의 동등한 효능임을 확인하였고, 도 4에 나타난 바와 같이, 총백 열수 추출물의 200 및 400 mg/kg의 용량에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 부동시간의 감소(각각 14.0% 및 20.3%)를 확인할 수 있었다.

[0057] **실험예 2. 수동회피실험에 의한 기억력 증강 효과 확인**

[0058] 해백 추출물의 기억력 증강 효과를 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 수동회피실험을 수행하였다(D.H. Kim, et al., The ameliorating effect of oroxylin A on scopolamine-induced memory impairment in mice, Neurobiol Learn Mem, 87, pp.536-546, 2007).

[0059] 실시예 1에서 수득한 해백 열수 추출물(AM-W) 및 95% 에탄올 추출물(AM-95E)을 여러 가지 용량으로 경구 투여하였다. 약물투여 1 시간 후에 쥐를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획에 놓고 10초의 탐색시간 후, 길로틴문(gillotin door)이 열려 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다. 이때 길로틴문이 열린 후 40초 이내에 어두운 쪽으로 들어가지 않는 쥐는 실험에서 제외시켰다. 길로틴문이 열린 후 쥐가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다. 일단 쥐가 어두운 쪽으로 들어가면 길로틴문이 닫히고 0.25 mA의 전기 충격이 3초 동안 격자 바닥을 통해 흐르게 되고 쥐는 이를 기억하게 하는 학습 실험을 실시하였다.

[0060] 학습 시험이 끝나고 24시간 후에, 쥐가 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가는 데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 600초까지 측정하였다. 걸리는 시간이 길수록 수동회피의 학

습과 기억이 좋음을 나타내었다.

[0061] 실험결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 해백 추출물을 투여한 쥐에서 대조군보다 탁월한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0062] **실험예 3. 해마의 치이랑(dentate gyrus)에서의 세포 분화에 미치는 효과 확인**

[0063] 해백 추출물의 해마의 치이랑에서의 세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실험하였다(G. Kronenberg, et al., Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli, J Comp Neurol, 467, pp.455-463, 2003)

[0064] **3-1. 면역화학 염색법**

[0065] 실시예에서 수득한 해백 열수 추출물(AM-W)을 14일 간 경구로 투여하였고, 11 및 12, 13일째에 50 mg/kg의 용량의 5-브로모-2-데옥시유리딘(5-bromo-2-deoxyuridine; BrdU)을 복강으로 투여하였다. 14일 째 투약 1시간 경과 후, 관류 고정시켜서 얻어진 뇌 절편에 BrdU와 특이적으로 결합하는 항체(Abcam Ltd. ab6326)를 붙이고, 이차 항체(Vector, BA-4000)를 다시 결합시킨 후, ABC 염색방법을 이용한 면역화학 염색법(D.H. Kim, et al., Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion-induced memory impairment in mice, Pharmacol Biochem Behav, 85, pp.658-668, 2006)으로 뇌 절편의 해마에서의 BrdU 포함 여부를 탐색하였다. 또한 동일 방법으로 얻은 뇌 절편에 더블코틴(Doublecortin; DCX)과 특이적으로 결합하는 항체(Santa Cruz, sc-8066)를 붙이고, 이차 항체(Vector, BA-5000)를 다시 결합시킨 후, ABC 염색방법을 이용한 면역화학 염색법으로 뇌 절편의 해마에서의 BrdU 포함 여부를 탐색하였다.

[0066] 실험결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 해백 열수 추출물(AM-W) 200 mg/kg의 용량을 투여한 군의 BrdU 포함 세포의 수가 대조군과 비교하여 유의성 있게 증가함(36.6%)을 확인할 수 있었으며, 이는 양성대조군으로 사용한 이미프라민(Sigma-Aldrich Chemistry) (41.4%)과 거의 동등한 효능임을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 도 7에 나타난 바와 같이, 해백 열수 추출물(AM-W)의 100 및 200 mg/kg의 용량에서 대조군과 비교하여 DCX 항체에 양성인 세포의 수가 유의성 있게 증가(각각 53.2%, 47.8%)하였고, 양성대조군으로 사용한 이미프라민(Sigma-Aldrich Chemistry) 군의 경우 58.7%의 증가를 확인할 수 있었다.

[0067] **3-2. 현미경 관찰**

[0068] 실시예에서 수득한 해백 열수 추출물(AM-W)을 14일 간 경구로 투여하였고, 12 및 13, 14일째에 50 mg/kg의 용량의 5-브로모-2-데옥시유리딘(5-bromo-2-deoxyuridine; BrdU)을 복강으로 투여하였다.

[0069] 그 후 14일간 동물을 방치하고, 28일 째 관류 고정시켜서 얻어진 뇌 절편에 BrdU 와 NeuN에 각각 특이적으로 결합하는 일차항체(BrdU: Abcam Ltd. ab6326; NeuN: chemicon;MAB377)를 붙이고, 형광 이차 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. 712-165-151, 712-095-153)를 다시 결합시킨 후, 공초점 주사 현미경(confocal scanning microscopy, Zeiss, LSM510)을 이용하여 BrdU 포함 세포 중 NeuN에 양성 반응을 나타내는 세포 수의 비율(Ratio% = (BrdU 포함 세포 중 NeuN에 양성 반응을 나타내는 세포 수)/BrdU 포함 세포 수*100)을 탐색하였다.

[0070] 실험결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 해백 열수 추출물(AM-W)의 100 및 200 mg/kg의 용량으로 투여한 군에서의 비율이 대조군과 비교하여 유의성 있게 증가함(각각 102.0% 및 99.8%)을 확인할 수 있었으며, 이는 양성대조군으로 사용한 이미프라민(Sigma-Aldrich Chemistry) (77.1%)과 비교하여 동등이상의 효능임을 확인할 수 있었다.

[0071] **실험예 4. 급성독성시험**

[0072] 참고예 1의 생쥐를 사용하여 상기 실시예에서 수득한 해백 추출물(AM-W 및 AM-95E)을 경구투여하여 급성독성 시험을 실시하였다. 급성독성 시험 결과, 해백 추출물의 경우는 그 투여 가능 용량인 2g/kg에서 사망예를 전혀 관찰할 수 없었으며, 체중 증가, 사료 섭취량 등에서 전혀 유의한 이상을 발견할 수 없었다. 따라서 해백 추출물

의 경우는 안전한 약물임을 알 수 있었다.

[0073] 하기에 본 발명의 해백 추출물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0074] **제제예 1. 산제의 제조**

[0075] AM-W 20 mg

[0076] 유당 100 mg

[0077] 탈크 10 mg

[0078] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0079] **제제예 2. 정제의 제조**

[0080] AM-95E 10 mg

[0081] 옥수수전분 100 mg

[0082] 유당 100 mg

[0083] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0084] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0085] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

[0086] AM-W 10 mg

[0087] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0088] 락토오스 14.8 mg

[0089] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0090] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0091] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0092] AM-95E 10 mg

[0093] 만니톨 180 mg

[0094] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0095] Na₂HPO₄·12H₂O 26 mg

[0096] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0097] **제제예 5. 액제의 제조**

[0098] AM-W 20 mg

[0099] 이성화당 10 g

[0100] 만니톨 5 g

[0101]	정제수	적량
[0102]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0103]	제제예 6. 건강 식품의 제조	
[0104]	AM-95E	1000 mg
[0105]	비타민 혼합물	적량
[0106]	비타민 A 아세테이트	70 μ g
[0107]	비타민 E	1.0 mg
[0108]	비타민 B1	0.13 mg
[0109]	비타민 B2	0.15 mg
[0110]	비타민 B6	0.5 mg
[0111]	비타민 B12	0.2 μ g
[0112]	비타민 C	10 mg
[0113]	비오틴	10 μ g
[0114]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0115]	엽산	50 μ g
[0116]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0117]	무기질 혼합물	적량
[0118]	황산제1철	1.75 mg
[0119]	산화아연	0.82 mg
[0120]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0121]	제1인산칼륨	15 mg
[0122]	제2인산칼슘	55 mg
[0123]	구연산칼륨	90 mg
[0124]	탄산칼슘	100 mg
[0125]	염화마그네슘	24.8 mg
[0126]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 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.	
[0127]	제제예 7. 건강 음료의 제조	
[0128]	AM-W	1000 mg
[0129]	구연산	1000 mg
[0130]	올리고당	100 g
[0131]	매실농축액	2 g

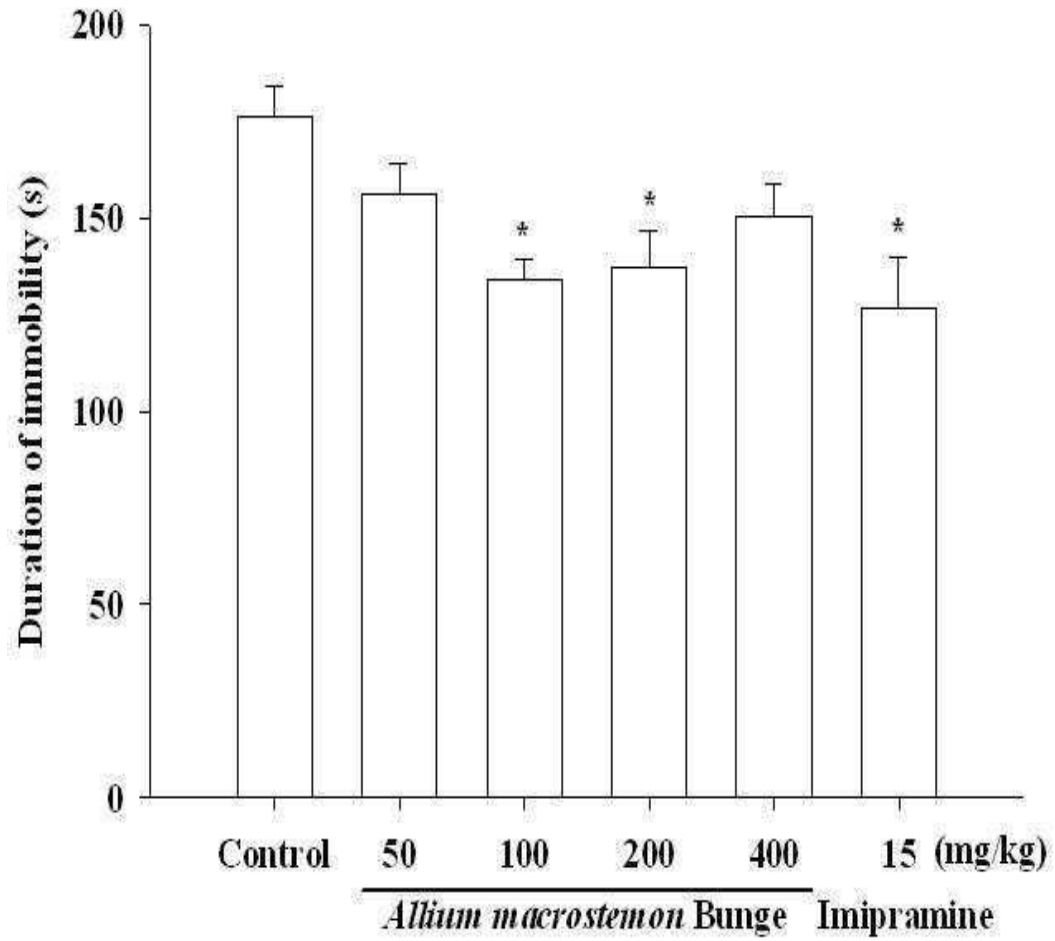
- | | | |
|--------|--|-----------|
| [0132] | 타우린 | 1 g |
| [0133] | 정제수를 가하여 | 전체 900 ml |
| [0134] | <p>통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.</p> | |
| [0135] | <p>상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.</p> | |
| [0136] | [이 발명을 지원한 국가연구개발사업] | |
| [0137] | [과제고유번호] | |
| [0138] | no. 10524 | |
| [0139] | [부처명] | |
| [0140] | 서울시정개발연구원 부설 산학연지원센터 | |
| [0141] | [연구사업명] | |
| [0142] | 노인성 질환계 천연물 신약 클러스터조성 사업 | |
| [0143] | [연구과제명] | |
| [0144] | 천연물 소재 항우울제 KHUR-4X의 상용화 | |
| [0145] | [주관기관] | |
| [0146] | 경희대학교 산학협력단 | |
| [0147] | [연구기간] | |
| [0148] | 2008년 12월 01일~2009년 11월 30일 | |

도면의 간단한 설명

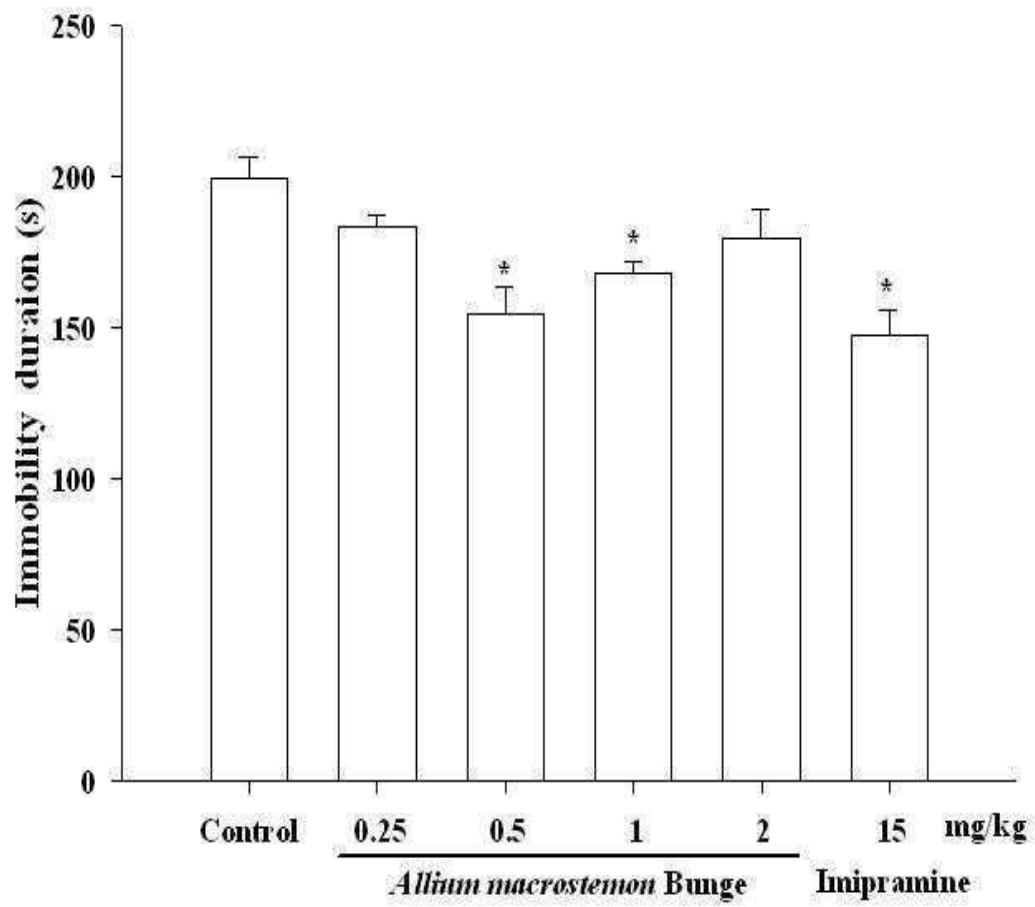
- [0149] 도 1은 본 발명의 해백의 열수 추출물을 투여한 생쥐에 대한 강제수영검사에 있어서 부동 시간을 대조군 및 양성대조군과 비교한 그래프이고,
- [0150] 도 2는 본 발명의 해백의 95% 에탄올 수용액 추출물을 투여한 생쥐에 대한 강제수영검사에 있어서 부동 시간을 대조군 및 양성대조군과 비교한 그래프이며,
- [0151] 도 3은 본 발명의 하수오 추출물을 투여한 생쥐에 대한 강제수영검사에 있어서 부동 시간을 대조군 및 양성대조군과 비교한 그래프이고,
- [0152] 도 4는 본 발명의 총백 추출물을 투여한 생쥐에 대한 강제수영검사에 있어서 부동 시간을 대조군 및 양성대조군과 비교한 그래프이며,
- [0153] 도 5는 본 발명의 해백의 열수 추출물을 투여한 생쥐에 대한 용량의존성 수동회피실험의 머무름 시간을 나타낸 도이고
- [0154] 도 6은 본 발명의 해백의 열수 추출물을 투여한 생쥐의 뇌 절편 중 치이랑에서의 BrdU 포함 세포의 수를 나타낸 도이며,
- [0155] 도 7은 본 발명의 해백의 열수 추출물을 투여한 생쥐의 뇌 절편 중 치이랑에서의 DCX를 발현하는 세포의 수를 나타낸 도이고,
- [0156] 도 8은 본 발명의 해백의 열수 추출물을 투여한 생쥐의 뇌 절편 중 치이랑에서의 BrdU 포함 세포 중 NeuN에 양성 반응을 나타내는 세포 수의 비율을 나타낸 도이다.

도면

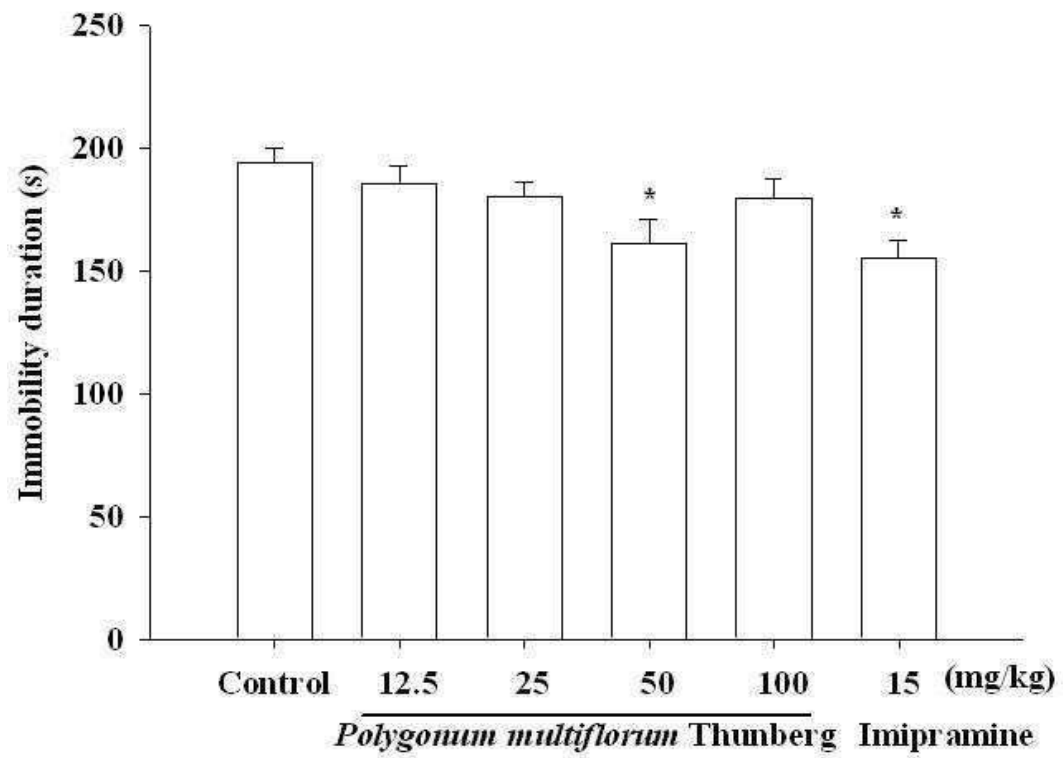
도면1



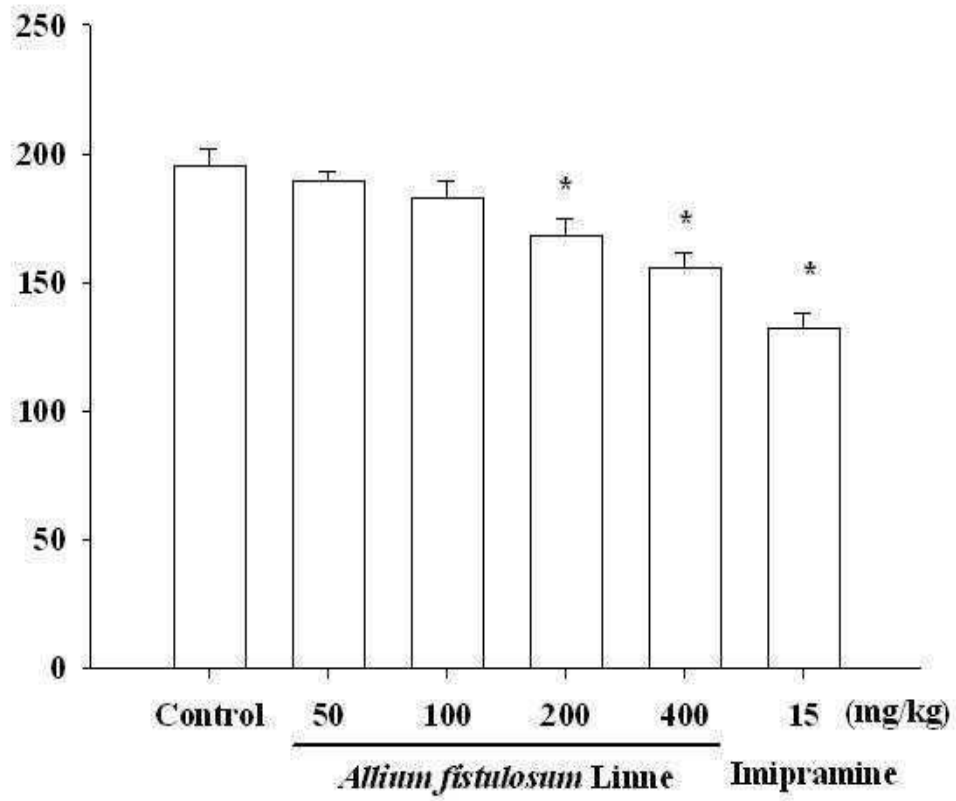
도면2



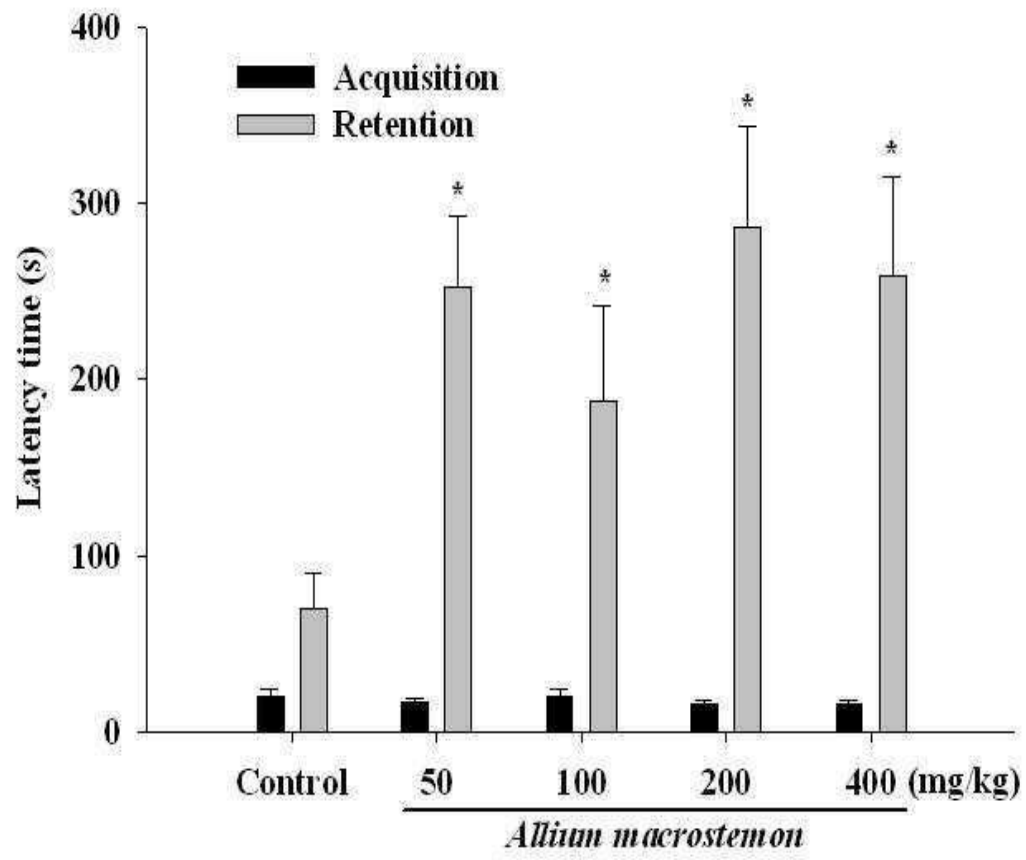
도면3



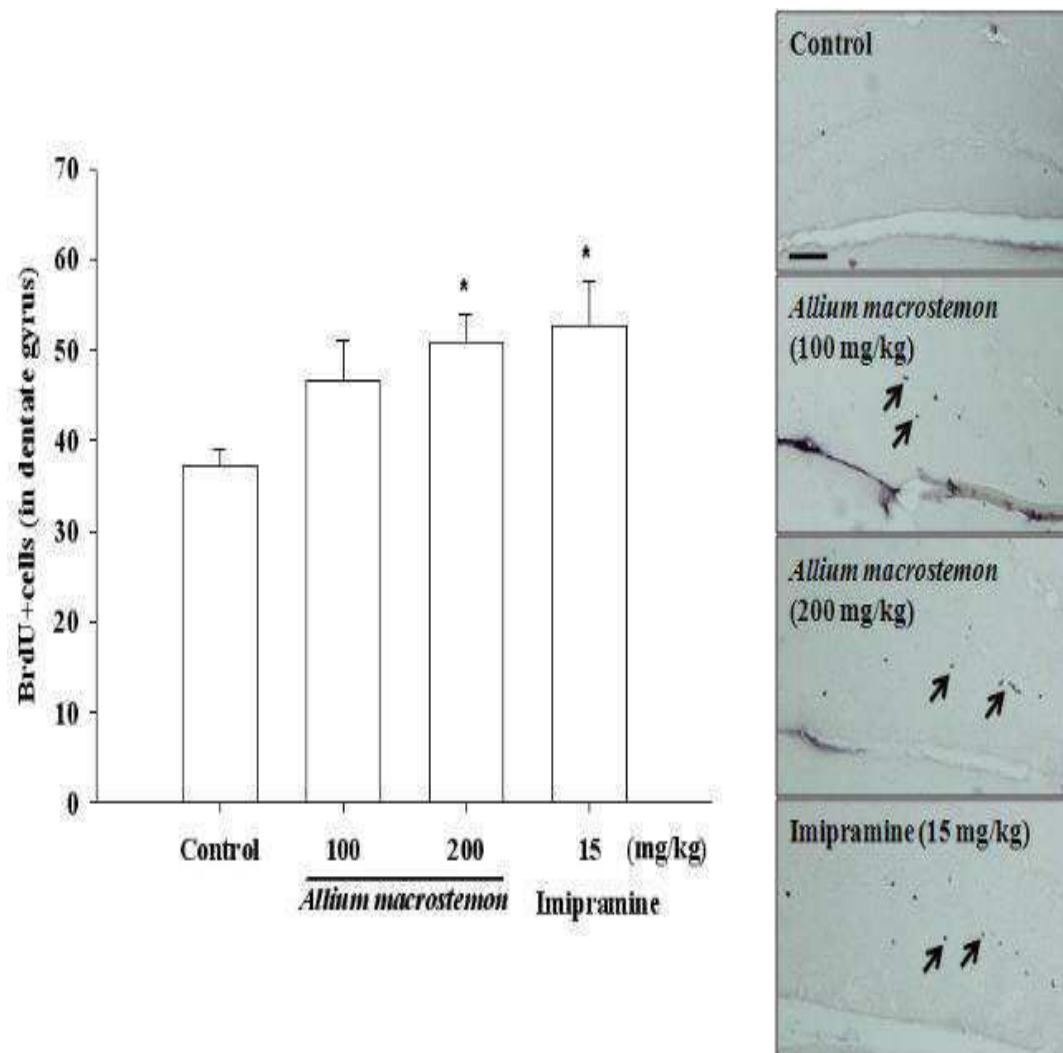
도면4



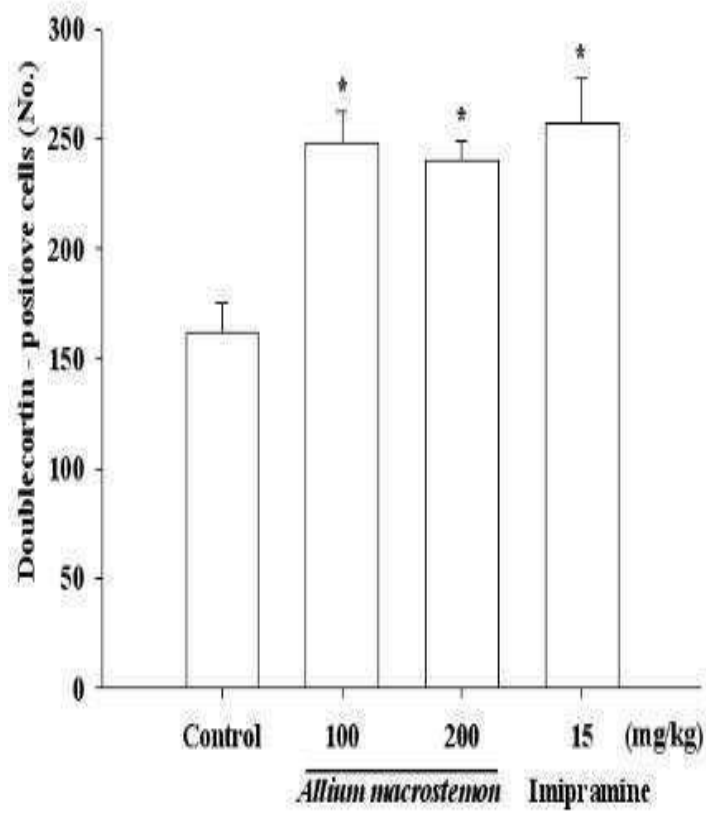
도면5



도면6



도면7



도면8

