



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월11일
(11) 등록번호 10-1307726
(24) 등록일자 2013년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/232 (2006.01) A61P 25/30 (2006.01)
A61P 25/34 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0077597
(22) 출원일자 2011년08월04일
심사청구일자 2011년08월04일
(65) 공개번호 10-2013-0015551
(43) 공개일자 2013년02월14일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020010009465 A
KR1019990002793 A
대한한의학회지, 12(1), 1975, pp.262-275

(73) 특허권자
대구한의대학교산학협력단
경상북도 경산시 상대로115길 37, 대구한의대학교
내(여천동)
(72) 발명자
양재하
대구광역시 남구 이천로5길 70-1 (봉덕동)
안은미
대구광역시 수성구 달구벌대로 3308, 유성푸르나
임르노블 208호 (신매동)
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
신동인

전체 청구항 수 : 총 3 항

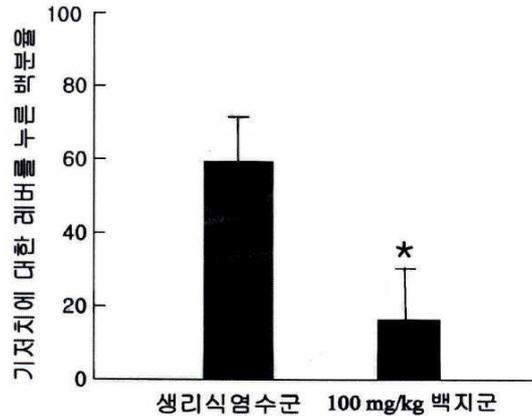
심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 백지추출물을 유효성분을 함유하는 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 백지추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 백지추출물은 약물 중독의 지표로 사용되는 보행성 활동량, 자가 투여량 및 약물에 대한 의존성을 급격히 감소시킴을 확인함으로써, 상기 조성물은 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 치료를 위한 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

강주봉

경기도 시흥시 수인로 2768 (도창동)

조희재

경기도 성남시 분당구 미금로 184, 102동 1502호
(구미동, 까치마을)

장은영

대구시 수성구 수성4가 1020-26번지

김홍유

대구광역시 달서구 대명천로 153, 우방아카시아
203동 412호 (본리동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 RIC01-1

부처명 지식경제부

연구사업명 지역혁신센터(RIC)사업

연구과제명 뇌질환 치료를 위한 한방소재 및 천연물 신약개발

주관기관 대구한의대학교

연구기간 2010.03.01 ~ 2011.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

백지 조추출물을 유효성분으로 함유하는 코카인(cocaine) 중독 및 금단증상의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 용매 또는 이들의 혼합 용매에 가용한 추출물인 약학조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

백지 조추출물을 유효성분으로 함유하는 코카인(cocaine) 중독 및 금단증상의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 7

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 백지추출물을 유효성분으로 함유하는 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] [문헌 1] Wiechman BE et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 15(3), pp.425-33, 1981

[0003] [문헌 2] Einhorn LC. et al., *J. Neurosci.*, 8(1), pp.100-12, 1988

[0004] [문헌 3] Parada A., et al., *Neuropharmacology*, 39(9), pp.1645-52, 2000

[0005] [문헌 4] Pontieri FE., et al., *Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, pp.12304-8, 1995

[0006] [문헌 5] Kuczenski R et al., *J. Neurosci.*, 11(9), pp.2703-12, 1991

[0007] [문헌 6] 김필순, 김영철 Brown guinea pig에서 백지 열수추출물의 미백효과. 한국환경보건학회지, 35(5):417-425, 2009

[0008] [문헌 7] Shalev U. et al., *Pharmacol. Rev* 54(1) pp1-42, 2002

[0009] [문헌 8] Harborne J.B., *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd

Ed., pp.6-7, 1998

- [0010] [문헌 9] 대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, pp.33-48, 1989
- [0011] [문헌 10] Karasinska JM et al., *Eur Neurosc.*, 22(7), pp.1741-50, 2005
- [0012] [문헌 11] Bachtell RK et al., *Psychopharmacology* 183(1), pp.41-53, 2005
- [0013] [문헌 12] 이형철 외, 동의병리학회지, 15(4), pp.543-47, 2001

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 과학문명의 발달과 급진하는 경제사회에 따른 현대인들의 잇따른 스트레스로 인해 약물 중독의 확산은 가장 중요한 현대 사회문제 중의 하나이다. 약물이란 질병을 예방, 치료하는데 사용되는 물질을 지칭하며, 신체기능의 변화를 일으키는 물질을 말한다. 이러한 약물의 남용은 부정적인 측면에서 신체적, 정신적, 사회적으로 자기 파괴의 문제를 발생시킨다. 약물 중독은 아편이나 신경안정제 또는 알코올과 같은 약물에 대한 신체적인 반응을 지칭한다. 이러한 약물 중독은 내성, 금단증상 및 습관화의 현상을 가지는데, 약물의 사용으로 인한 통제력 상실을 의미하기도 한다. 최근의 약물남용은 청소년, 여성 약물남용자의 증가로 인한 세계적으로 심각한 정신질환 중의 하나로서, 중독성 약물에 대한 치료제의 개발은 시급한 현실이다.
- [0015] 이러한 약물 중독의 해결책으로 여러 가지 사회정책 및 치료, 재활을 위한 프로그램이 이루어지고 있지만, 근본적인 치료대책으로서, 한계점을 가지고 있다.
- [0016] 코카인 (cocaine), 암페타민 (amphetamine), 모르핀 (morphine) 등과 같은 중독성 약물들은 약물투여에 따른 보행성 활동량을 증가시킨다 (Wiechman BE et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 15(3), pp425-33, 1981). 따라서, 이러한 보행성 활동량은 약물 중독의 지표로 사용되고 있다.
- [0017] 코카인은 약물강화효과를 통하여 탐닉현상이 생기는데, 이러한 행동적 변화에 영향을 주는 요인이 도파민 (Dopamine, DA) 신경전달계의 활성화이다. 특히, 코카인 투여로 인한 보상 및 강화작용은 복측 피개 영역 (Ventral tegmental area, VTA)의 A10 신경 (A10 neuron)에서 기시하여 측핵 (Nucleus accumbens)으로 투사되는 중뇌 변연계가 중요한 역할을 맡고 있다고 알려져 있다 (Einhorn LC. et al., *J. Neurosci.*, 8(1), pp100-12, 1988).
- [0018] 최근의 연구들을 보면 코카인의 투여로 인하여 약물 중독과 관련이 있는 측핵 및 선조체 등의 도파민성 신경세포의 투사부위에서 신경활성의 지표라고 알려진 초기 유전자 c-Fos (Immediate early gene c-Fos)의 단백질인 c-Fos발현이 증가되었다는 보고가 있다. 실험동물에 반복적으로 도파민 D1 수용체 효능제인 SKF-38393를 투여한 경우, 보행성 활동량과 신경활성도의 지표인 c-Fos의 발현이 증가되었다. 또한 도파민의 길항물질인 SCH 23390을 투여한 결과, 코카인에 의한 보행성 활동량이 줄어들었다 (Parada A., et al., *Neuropharmacology*, 39(9), pp1645-52, 2000). 생체내 (In vivo) 미세투석법 (Microdialysis)을 이용하여 관찰한 실험에서 약물 중독과 관련있는 부위인 선조체 및 측핵에서 코카인 투여로 인한 도파민의 농도는 현저하게 증가하였으며 (Pontieri FE., et al., *Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, pp12304-8, 1995), 이는 또한, 보행성 활동량이 증가를 보임으로써, 생화학적 측면인 도파민과 행동학적인 측면인 보행성 활동량이 상관관계가 있음을 보여주는 실험적인 증거를 제시하였다 (Kuczenski R et al., *J. Neurosci.*, 11(9), pp2703-12, 1991).
- [0019] 자가 투여장치는 동물이 수동적으로 약물을 투여 받는 것이 아니라, 능동적이고 자발적인 자유의지에 따라 약물을 투여 받는 실험 방법으로서 많은 약물남용의 기전연구 및 치료제개발에 이용되어 지고 있다. 자가 투여장치를 이용한 실험을 보면, 도파민 효현제를 투여하면 코카인 강화효과를 억제하며, 반대로 도파민 길항제 SCH23390을 전처치하면 동물의 코카인에 대한 자가 투여반응이 증가하게 되는데 이것은 측좌핵에서 도파민에 대한 보상효과에 의한 것이다. 또한 억제성 신경전달 물질인 가바 효현제인 바클로펜을 전처치 한 결과 코카인에 대한 자가 투여반응이 감소한다고 보고되고 있다 (Shalev U. et al., *Pharmacol. Rev* 54(1) pp1-42, 2002).
- [0020] 본 발명의 백지(Angelica dahurica)는 대활(大活), 흥안, 독활, 구리대, 굼베지라고도 한다. 미나리과의 다년생 식물의 뿌리로 달고 매우며 따뜻한 성질이 있고 독이 없다고 알려져 있으며 산골짜기 냇가에서 자란다. 풀 전체에 털이 없고 뿌리줄기는 매우 굵으며 수염뿌리가 많이 내린다. 줄기는 곧게 서고 높이 1~2 m이다. 잎은 3개씩

2~3회 깃꼴겹잎으로 많이 갈라지고 갈라진 조각은 타원형 또는 바소꼴로 끝이 뾰족하며 고르지 못한 톱니가 있다. 6~8월에 흰색 꽃이 피는데 20~40개의 산형꽃차례가 모여 겹산형꽃차례를 이룬다. 총포는 없고 작은 총포는 가늘며 작다. 화관은 작고 꽃잎 5개, 수술 5개 그리고 1개의 씨방은 꽃받침 아래 위치한다. 열매는 분과로서 타원형이고 날개가 있으며 10월에 익는다. 한방에서는 뿌리를 말려 만든 생약을 백지라 하여 한국, 일본, 중국 북동부, 동부 시베리아 등지에 분포한다. 백지의 주요성분은 앵게리코톡신(angelicotoxin), 백-앵게리산(byak-angelicin), 옥시퓨시다린(oxypeucedanin), 백-앵게리콜(byak-angelicol), 임페라토린(imperatorin), 이소임페라토린(isoimperatorin)으로 구성된다. 알려진 약리효과로는 항균작용, 미주신경 및 척수부의 흥분작용과 동맥 혈류량 증가 등이 있으며 두통에 효과가 있고 특히 미백 및 피부병에 효과가 있다(한국환경보건학회지, 35(5):417-425, 2009).

[0021] 그러나, 상기 문헌 어디에도 백지추출물이 약물 중독 및 금단증상에 효과적이라는 어떠한 개시도 된 바가 없다.

[0022] 이에 본 발명자들은 백지추출물이 약물 중독의 지표로 사용되는 보행성 활동량, 자가 투여량 및 약물에 대한 의존성을 급격히 감소시킴을 확인함으로써, 약물 중독 및 금단증상의 치료 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기 목적을 달성하기 위하여, 백지추출물을 유효성분으로 함유하는 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은, 백지추출물을 유효성분으로 함유하는 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0025] 본원에서 정의되는 백지추출물은 백지 조추출물 또는 백지 분획물을 포함하며, 상기 조추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 용매 또는 이들의 혼합 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합 용매, 보다 바람직하게는 50 내지 99% 에탄올 혼합용매에 가용한 추출물을 포함하며, 상기 백지 분획물핵산, 클로로포름, 디에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드 등, 바람직하게는 에틸아세테이트에 가용한 비극성용매 가용추출물 및 상기 비극성 용매 가용추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 핵산과 에틸아세테이트의 이동상으로 극성을 증가시켜가면서 (15:1→10:1) 총 23개의 분획물 (ADE-1~ADE-23)의 분획물을 얻고 다시 이중 ADE-22 분획물에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법으로 핵산과 에틸아세테이트를 이용하여 총 23개의 소분획물 (ADE-22-1~ADE-22-23)을 얻은 후, 다시 이들 소분획물중 ADE-22-13번 소분획물을 클로로포름과 메탄올 20:1의 이동상을 이용하여 실리카겔 컬럼을 이용하여 얻은 17개의 소분획물 (ADE-22-13-1~ADE-22-13-17)을 포함하며, 바람직하게는, ADE22-13번 분획물, ADE22-13-6 번 및 22-13-7번 분획물을 포함한다.

[0026] 본원에서 정의되는 약물은 코카인 (cocaine), 메스암페타민 (methamphetamine), 알코올 (alcohol), 니코틴 (nicotine) 또는 모르핀 (morphine)을 포함한다.

[0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명의 백지추출물은 하기와 같이 제조될 수 있다.

[0029] 본 발명의 백지를 음건하여 마쇄한 후, 건조된 백지 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 5 내지 15배 분량의 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 용매 및 이들의 혼합 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합 용매, 보다 바람직하게는 50 내지 99% 에탄올 혼합용매로, 실온에서 약 1일 내지 1주일, 바람직하게는 24시간 내지 72시간 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 냉침 추출한 후 수득한 추출액을 여과, 감압 농축 또는 건조하여 본 발명의 백지추출물을 수득할 수 있다. 또한 상기 단계에서 얻은 백지 조추출물을 용매분획법을 수행하여 핵산, 클로로포름, 디에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드 등, 바람직하게는 에틸아세테이트에 가용한 비극성용매 가용추출물을 수득가능하고 추가로 상기 비극성 용매 가용추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 핵산과 에틸아세테이트의 이동상으로 극성을 증가시켜가면서 (15:1→10:1) 총 23개의 분획물 (ADE-1~ADE-23)의 분획물을 얻고 다시 이중 ADE-22 분획물에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법으로 핵산과 에틸아세테이트를 이용하여 총 23개의 소분획물 (ADE-22-1~ADE-22-23)을 얻은 후, 다시 이들 소분획물중 ADE-22-13번 소분획물을 클로로포름과 메탄올 20:1의 이동상을 이용하여 실리카겔 컬럼을 이용하여 17개의 소분획물 (ADE-22-13-1~ADE-22-13-17)을 수득가능하다.

- [0030] 본 발명은 상기 제조방법으로 수득한 백지추출물을 유효성분으로 함유하는 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 50% 중량으로 포함한다.
- [0032] 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 백지추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 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, 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, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 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 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, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0035] 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, 본 발명의 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. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0036] 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.
- [0037] 또한, 본 발명은 백지추출물을 유효성분으로 함유하는 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0038] 본원에서 정의되는 “건강기능식품”은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0039] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 백지추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 백지추출물 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0041] 본 발명의 상기 추출물은 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 치료를 위한 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중

량의 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.

[0042] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 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 레마우디오시드 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.

[0043] 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

[0044] 본 발명의 백지추출물은 약물 중독의 지표로 사용되는 보행성 활동량, 자가 투여량 및 약물에 대한 의존성을 급격히 감소시키는 효과를 나타내는 바, 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 약물 투여로 인한 랫트의 보행성 활동량에 대한 백지추출물의 효과를 나타낸 도이고,
 도 2은 약물의 자가 투여장치를 이용한 코카인 자가 섭취량에 대한 백지추출물의 효과를 나타낸 도이며,
 도 3은 자가 투여장치를 이용한 코카인 재발 동물 모델에서의 백지추출물의 효과를 나타내는 도이며,
 도 4는 약물의 자가 투여장치를 이용한 코카인 자가 섭취량에 대한 백지 fraction들의 효과를 나타낸 도이며,
 도 5는 약물의 자가 투여장치를 이용한 코카인 자가 섭취량에 대한 백지 fraction ADE20 및 ADE22 들의 효과를 나타낸 도이며,
 도 6은 약물의 자가 투여장치를 이용한 코카인 자가 섭취량에 대한 백지 fraction ADE22-13으로부터 분리된 성분들의 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 발명을 하기 참고예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0047] 단, 하기 참고예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예, 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0048] 참고예 1. 실험동물의 준비

[0049] 실험동물은 체중 250-300 g의 스프라그-다우리 (Sprague-Dawley)계 수컷 랫트 (효창사이언스)를 사용하였고, 대구한의대학교 동물사육실에서 일정한 조건 (온도: 21±2, 명암: 12시간 명암주기)에서, 사료와 음수의 자유로운 섭취가 가능하도록 하였으며, 실험시작 전까지 물과 먹이를 충분히 제공하며 실험시작 전에 실험동물을 3일 동안 하루에 10분씩 사전취급 (Handling)한다.

- [0050] **참고예 2. 통계처리**
- [0051] 보행성 활동량은 박스 내에서 수평이동거리 (cm)로 측정하였으며, 자가 투여장치 실험은 랫트의 자발적인 약물 섭취반응수를 측정하여 기록하였다. 통계적 유의성은 SPSS 프로그램 (Version 11.01)의 원웨이 (one-way) ANOVA로 검정하여 p값이 0.05이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.
- [0052] **실시에 1. 백지추출물의 제조**
- [0053] 1-1. 95% 에탄올 추출물의 제조
- [0054] 대원약업사에서 구입한 백지 6 kg을 음건하여 세절한 후, 건조된 백지 6 kg에 (8L, 4회) 2배 용량의 95% 에탄올을 가하고, 실온에서 48시간 동안 추출하여 수득한 추출액을 여과한 후, Rotary evaporate (EYELA, N-1000)으로 감압 농축하여 백지추출물 254 g을 수득하였다 (이하 “AD95E”라 함).
- [0055] 1-2. 백지 분획물들의 제조
- [0056] 상기 1-1단계에서 얻은 백지 추출물 655 g을 용매 계통분획하여 에틸아세테이트 분획 (이하 “ADE”라 함), 부탄올 분획 및 물 분획물을 제조하였다. 이중 에틸아세테이트 분획물 (215 g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 헥산과 에틸아세테이트의 이동상으로 극성을 증가시켜가면서 (15:1→10:1) 총 23개의 분획물 (ADE-1~ADE-23)의 분획물을 얻었다. 이중 ADE-22 분획물 (11.14 g)에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법으로 헥산과 에틸아세테이트를 이용하여 총 23개의 소분획물 (ADE-22-1~ADE-22-23)을 얻었다. 다시 이들 소분획물중 ADE-22-13번 소분획물을 클로로포름과 메탄올 20:1의 이동상을 이용하여 실리카겔 컬럼을 이용하여 17개의 소분획물 (ADE-22-13-1~ADE-22-13-17)을 얻었다.
- [0057] **실험예 1. 급성 및 만성 약물 투여 후 행동적 민감성에 대한 백지추출물의 효과**
- [0058] 급성 및 만성 약물 투여로 의한 행동적 민감성에 대한 상기 실시예 1의 백지추출물의 효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 코카인 투여 후 랫트의 보행성 활동량 변화에 대한 실험을 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 방법으로 수행하였다 (Karasinska JM et al., *Eur Neurosci.*, 22(7), pp.1741-50, 2005).
- [0059] 1-1. 보행성 활동량의 측정 방법
- [0060] 실험동물의 보행성 활동량은 videotracking을 이용하여 Ethovision program (Noldus Information Technology BV, Wageningen, Netherlands)으로 측정하였다. 보행성 활동량은 가로, 세로, 높이가 각각 40 x 40 x 45 cm로 만들어진 검은색의 무광택 아크릴 상자 안에 넣어 실험동물의 움직임을 상자 위에 설치된 카메라 (digital camera; SDC-411ND, SAMSUNG)를 사용하여 videotracking 방법으로 측정하였다. 실험절차는 행동 측정 당일 날, 실험동물의 몸무게를 측정 후, 9개의 활동량 측정상자에 개별적으로 넣어 1시간 동안의 적응시간을 거친 다음, 그 후 1시간 동안 동물의 안정시의 보행성 활동량을 측정하였다. 그리고 난 후, 비히클 (vehicle) 및 백지 추출물 100 mg/kg를 1 ml/kg 기준으로 복강주사하고, 약물이 충분히 몸 안에서 흡수되도록 30분 동안 두었다. 백지 투여 30분 후, 코카인 (15 mg/kg)를 복강 주사 한 후에, 1시간 동안 보행성 활동량을 측정하였다. Vehicle은 70% polyethylene glycol, 10% EtOH, 1% Tween 80, 생리식염수로 이루어진 것으로 사용하였다.
- [0061] 1-2. 보행성 활동량의 측정
- [0062] 실험동물을 7일 동안 homecage에서 (day 1-7) 정상군 (SS)은 생리식염수를, 대조군1 (SC, 급성코카인투여군)은 코카인을, 대조군2 (CC, 만성코카인투여군)은 코카인 15 mg/kg를, 급성군은 생리식염수를, 만성군은 백지 추출물 100 mg/kg를 복강투여하고 나서 30분 후에 코카인을 주사하였다. 그리고 나서 3일 동안의 철회기간을 거치는데, 만성군에서는 백지 추출물만 복강 주사 하였다. 11일째 행동 측정 당일 날에 상기 참고예 1에서 준비된 실험동물을 사육장에서 외부소음이 차단된 실험실로 옮겨 각각 무게를 측정 후, 9개의 활동량 측정상자에 개별

적으로 넣었다. 상자 내에서 60분간 적응시간을 거쳐 60분간 기저 활동량을 측정 한 후, vehicle 또는 백지추출물 100 mg/kg을 복강 주사하고 30분 후 생리식염수 또는 코카인 15 mg/kg를 복강 주사하여 60분 동안 보행성 활동량 (cm)을 측정하였다.

[0063] 본 실험결과, 도 1에서 나타내는 바와 같이, 11일째 행동 측정 결과 정상군(SS)은 551.4350±216.60 cm, 급성 코카인 투여군 (SC)은 15020.27±5585.31 cm, 대조군(CC)은 19259.15±4842.41 cm, 급성 백지추출물 100 mg/kg 투여군은 8971.6940±2146.21 cm, 만성 백지추출물 100 mg/kg은 2920.28±1841.08 cm로 만성 백지추출물 투여군은 대조군에 비해 보행성 활동량이 유의하게 감소되었음을 확인할 수 있었다.

표 1

실험군	전처리 (Day 1-7)	Withdrawal (Day 8-10)	행동측정 (Day 11)
정상군(SS)	생리식염수	X	vehicle+생리식염수
대조군(SC)	생리식염수	X	vehicle+코카인
대조군(CC)	코카인	X	vehicle+코카인
급성(Acute Angellca dahur lca)	코카인	X	백지+코카인
만성(chronic Angellca dahur lca)	백지 +코카인	백지	백지+코카인
↓			
실험군	처리내용 (day 11)	코카인 투여 후 1시간 동안의 보행성 활동량(cm)	
정상군(SS)	vehicle+생리식염수	551.44±16.60	
대조군(SC)	vehicle+코카인	15020.27±585.31	
대조군(CC)	vehicle+코카인	19259.15±842.41	
급성(Acute Angellca dahur lca)	백지 +코카인	8971.69±2146.21	
만성(chronic Angellca dahur lca)	백지+코카인	2920.2725±1841.08	

[0065] 실험예 2. 자가 투여장치를 이용한 코카인 자가 섭취에 대한 백지추출물의 효과

[0066] 약물 투여에 의한 자가 섭취 반응수 변화에 상기 실시예 1에서 얻은 백지추출물이 미치는 효과를 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Bachtell RK et al., *Psychopharmacology* 183(1) 41-53, 2005).

[0067] 자가 섭취 방법의 확립을 위하여 랫트에게 먼저 사육실 homecage에서 1주일의 순응기간을 거친 후 접근이 가능한 두개의 레버 (활성레버를 누르면 약물 혹은 먹이가 나오고, 비활성레버를 누르면 눌러도 약물이나 먹이가 나오지 않도록 프로그램상 설정해 놓음)를 가진 방에서 3일 연속 3시간 동안 펠렛 (pellet)을 획득하도록 훈련기간을 거친 후, 이 조건을 만족한 랫트는 먼저 펜토바르비탈 50 mg/kg의 용량으로 복강주사하여 마취를 시킨 뒤에, 목주위를 절개 후, 코카인 자가투여를 위해 쇄골하정맥에 카놀라 (cannular)를 삽입한 뒤 절개 부분을 봉합한다. 수술이 끝난 랫트는 다시 통제된 사육실에서 먹이와 물을 자유롭게 섭취하도록 하여 회복기간을 거친 후 사용하였다. 수술 후 동물들은 1주일여 여섯 번 1시간 동안 염산코카인 (0.25 mg/kg)으로 레버를 누르는 훈련을 받으며, 3일 연속의 레버를 누르는 반응수가 안정되면 실험당일 검사단계에서 테스트 30분 전 백지추출물 (100 mg/kg) 또는 분리한 fraction들을 복강투여한 후 자발적 약물 섭취 반응수를 관찰한다.

[0068] 실험결과, 도 2에서 나타내는 바와 같이 생리식염수 1 ml/kg 처치군과 비교하여 백지추출물을 처리된 랫트에서 유의성 있게 코카인에 대한 자가 섭취 반응이 급격히 감소되었음을 확인할 수 있었다.

[0069] 실험예 3. 자가 투여장치를 이용한 코카인 재발억제에 대한 백지추출물의 효과

[0070] 자가투여장치를 이용한 코카인 재발억제에 대한 상기 실시예 1에서 얻은 백지추출물이 미치는 효과를 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Bachtell RK et al., *Psychopharmacology* 183(1) 41-53, 2005).

[0071] 자가 섭취 방법의 확립을 위하여 랫트에게 먼저 1주일의 순응기간을 거친 후 접근이 가능한 두개의 레버를 가진 방에서 3일 연속 3시간 동안 100개의 펠렛 (pellet)을 획득하도록 훈련기간을 거친 후, 이 조건을 만족한 동물은 정맥 수술을 받으며, 수술이 끝난 랫트는 다시 통제된 사육실에서 먹이와 물을 자유롭게 섭취하여 회복기간

을 거친 후 사용하였다. 수술 후 동물들은 1주일에 여섯 번 2시간 동안 염산코카인 (0.25 mg/kg)으로 훈련을 받으며, 3일 연속 반응수가 안정되면 레버를 눌러도 코카인이 나오지 않는 금단기간을 거친다. 금단기간 동안 3일 연속 안정된 반응을 보이면 코카인 용량 10 mg/kg를 복강투여 하여 약물에 대한 의존성을 관찰한다. 또한 코카인 복강투여 30분전 백지추출물 100 mg/kg을 복강투여 하여 약물에 대한 의존성을 관찰한다.

[0072] 실험결과, 도 3에서 나타내는 바와 같이 1 ml/kg 생리식염수 처치군과 비교하여 백지추출물 100 mg/kg이 처리된 랫트에서 유의성 있게 코카인에 대한 의존성이 급격히 감소되었음을 확인할 수 있었다.

[0073] **실험예 4. 자가 투여장치를 이용한 코카인 자가섭취에 대한 백지fraction 및 그 성분들의 효과**

[0074] 약물 투여에 의한 자가 섭취 반응수 변화에 상기 실시예 1에서 얻은 백지 분획물들이 미치는 효과를 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Bachtell RK et al., *Psychopharmacology* 183(1) 41-53, 2005).

[0075] 실험예 2에서의 동일한 방법으로 백지 분획물 (fraction)들의 코카인 자가 섭취에 대한 효과를 확인한 결과, 도 4에서와 같이 ADE 20과 ADE22번이 basal level에 비해 자가섭취량이 감소함을 확인 할 수 있었다. 또다시 ADE 20에서 분리한 fraction들과 ADE22에서 분리한 fraction들의 코카인 자가섭취량을 확인한 결과, 도 5에서와 같이 ADE20에서 분리한 fraction들은 자가섭취량의 감소가 없었고, ADE22에서 분리한 ADE22-13번에서 코카인 자가섭취량이 감소하였다. ADE 22-13번에서 효과가 있을 것으로 확인되어 ADE22-13으로부터 분리하여 코카인 자가섭취량을 확인한 결과, ADE22-13-6 번과 22-13-7번에서 basal level에 비해 코카인 자가섭취량의 감소효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0076] **실험예 5. 급성독성실험**

[0077] 상기 실시예 1에서 얻은 백지추출물의 투여에 의한 독성을 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (이형철 외, *동의병리학회지*, 15(4), pp543-47, 2001).

[0078] 6 주령의 특정병원체부재 (Specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 각 그룹당 2마리씩의 동물에 본 발명의 백지추출물을 500 mg/kg의 용량으로 1회 경구투여 하였다. 실험물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 강장기와 흉강 장기의 이상여부를 관찰하였다.

[0079] 그 결과, 실험 물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

[0080] 실험결과, 본 발명의 백지추출물은 랫트에서 각각 500 mg/kg 까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량 (LD₅₀)은 500 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

[0081] 하기에 본 발명의 백지추출물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0082] **제제예 1. 산제의 제조**

[0083]	백지추출물(ADE)	20 mg
[0084]	유당	100 mg
[0085]	탈크	10 mg

[0086] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0087] **제제예 2. 정제의 제조**

[0088]	백지추출물(ADE)	10 mg
--------	------------	-------

[0089]	옥수수전분	100 mg
[0090]	유당	100 mg
[0091]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0092]	상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.	

[0093] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

[0094]	백지추출물(ADE)	10 mg
[0095]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0096]	락토오스	14.8 mg
[0097]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0098]	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.	

[0099] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0100]	백지추출물(ADE)	10 mg
[0101]	만니톨	180 mg
[0102]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0103]	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	26 mg
[0104]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	

[0105] **제제예 5. 액제의 제조**

[0106]	백지추출물(ADE)	20 mg
[0107]	이성화당	10 g
[0108]	만니톨	5 g
[0109]	정제수	적량
[0110]	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.	

[0111] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

[0112]	백지추출물(ADE)	1000 mg
[0113]	비타민 혼합물	적량
[0114]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0115]	비타민 E	1.0 mg
[0116]	비타민 B1	0.13 mg
[0117]	비타민 B2	0.15 mg
[0118]	비타민 B6	0.5 mg

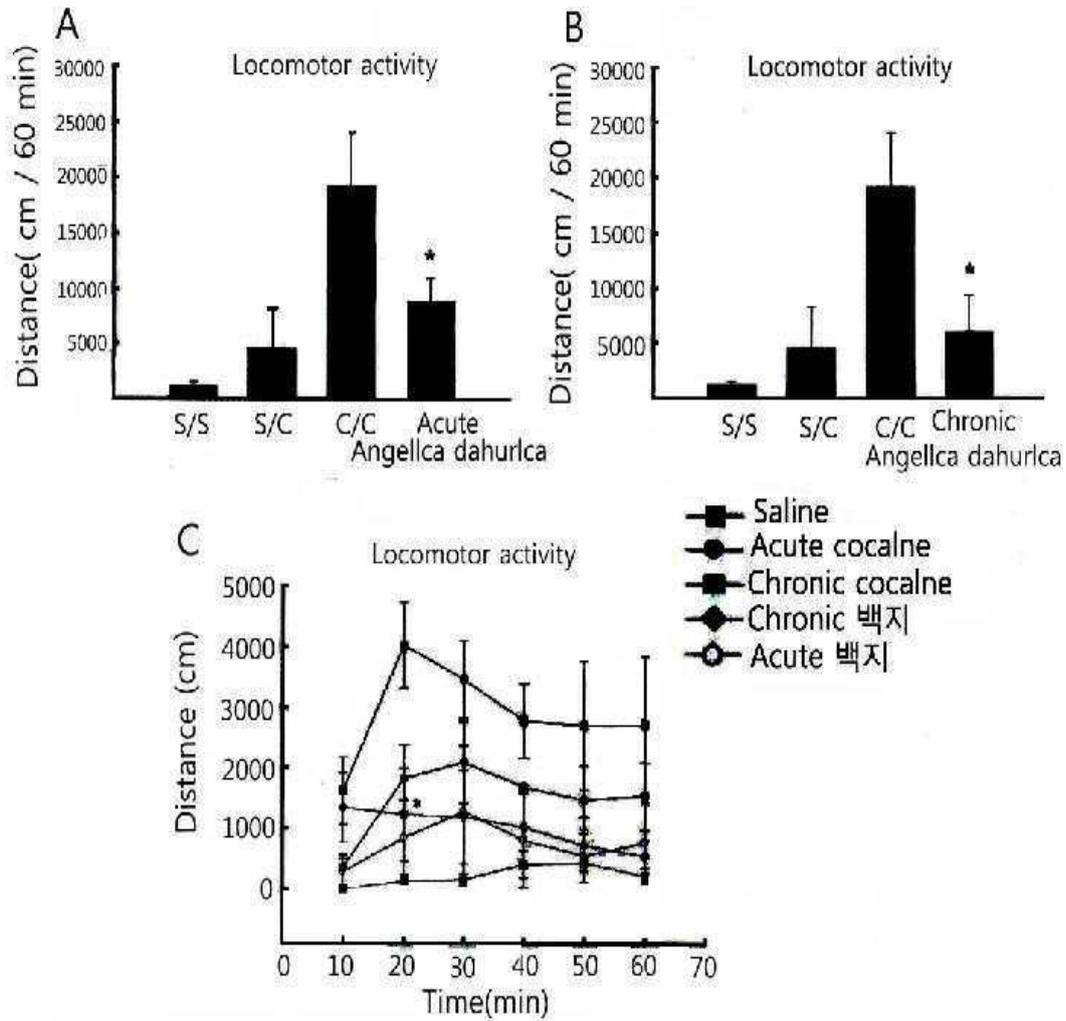
[0119]	비타민 B12	0.2 μ g
[0120]	비타민 C	10 mg
[0121]	비오틴	10 μ g
[0122]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0123]	엽산	50 μ g
[0124]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0125]	무기질 혼합물	적량
[0126]	황산제1철	1.75 mg
[0127]	산화아연	0.82 mg
[0128]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0129]	제1인산칼륨	15 mg
[0130]	제2인산칼슘	55 mg
[0131]	구연산칼륨	90 mg
[0132]	탄산칼슘	100 mg
[0133]	염화마그네슘	24.8 mg
[0134]	<p>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.</p>	

[0135] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

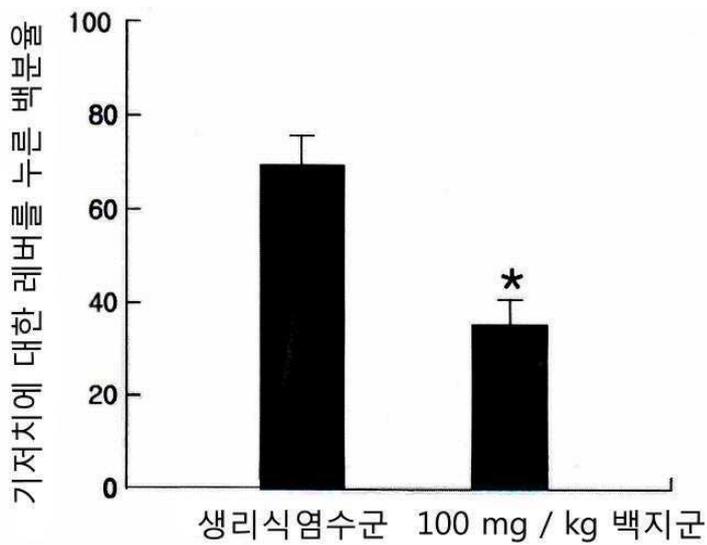
[0136]	백지추출물(ADE)	1000 mg
[0137]	구연산	1000 mg
[0138]	올리고당	100 g
[0139]	매실농축액	2 g
[0140]	타우린	1 g
[0141]	정제수를 가하여	전체 900 ml
[0142]	<p>통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.</p>	
[0143]	<p>상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.</p>	

도면

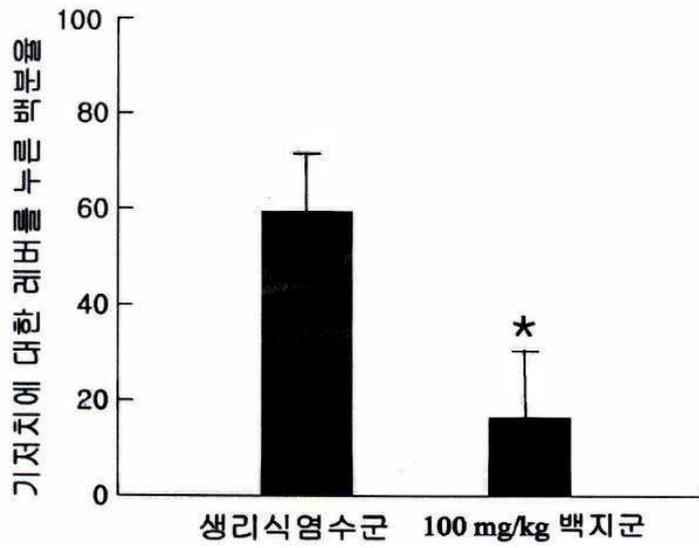
도면1



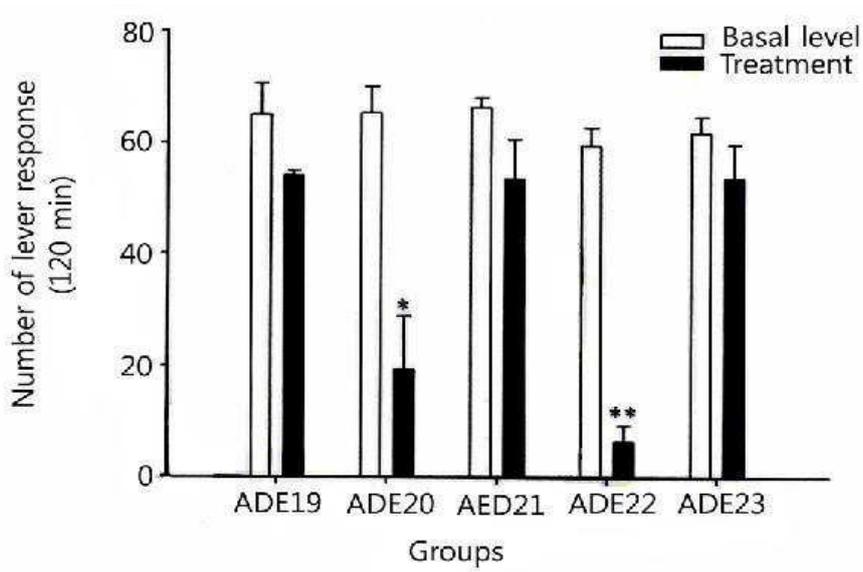
도면2



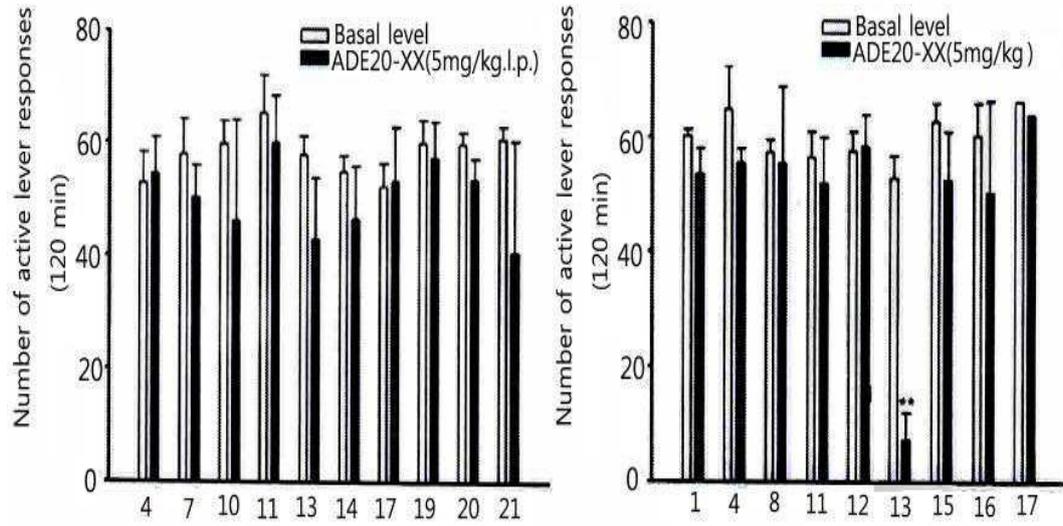
도면3



도면4



도면5



도면6

