(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0145932
(43) 공개일자 2014년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/19 (2006.01) *A61K 36/40* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0152171(분할)
(22) 출원일자 2013년12월09일
심사청구일자 2013년12월09일
(62) 원출원 특허 10-2012-0089993
원출원일자 2012년08월17일
심사청구일자 2012년08월17일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
김동현
서울 성북구 선잠로 92-24, (성북동)
한명주
서울 성북구 선잠로 92-24, (성북동)
장세은
서울 도봉구 도봉로150바길 26, 101동 403호 (방학동, 금광포란재아파트)
(74) 대리인
고영갑, 임상엽, 권정기, 권영준

전체 청구항 수 : 총 9 항

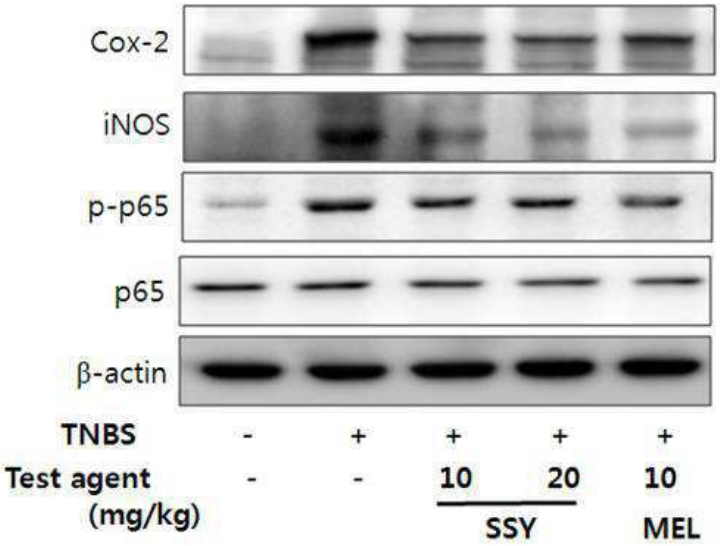
(54) 발명의 명칭 **산수유 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 산수유 추출물 등의 신규 용도에 관한 것으로서, 산수유 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 단리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 산수유 추출물, 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물 또는 산수유로부터 단리된 우르솔산(Ursolic acid) 등은 약학 조성물 또는 식품 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있고, 이러한 약학 조성물 또는 식품 조성물은 대장염, 특히 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 또는 과민성 대장염 증후군((irritable bowel syndrome, IBS)등을 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물을 유효성분으로 포함하고,

상기 알코올은 탄소 수가 3 내지 8인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 알코올은 부탄올인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 대장염은 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 산수유 추출물은 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출되는 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물은 산수유 추출물에 물을 가하여 현탁시킨 후, 알코올을 첨가하고 분획하여 수득한 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물은 우르솔산(Ursolic acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 산수유는 산수유 씨인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 산수유 씨는 오일 성분이 제거된 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물을 유효성분으로 포함하고,

상기 알코올은 탄소 수가 3 내지 8인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 산수유 추출물 등의 신규 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 산수유 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대장염은 대장에 염증이 발생하는 질환으로, 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD), 과민성 대장염 증후군((irritable bowel syndrome, IBS)등을 포함한다. 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 중 대표적인 질환인 궤양성 대장염(ulcerative colitis; UC)과 크론병(Crohn's disease; CD)은 아직 원인이 명확히 밝혀져 있지 않고 있으며, 복통과 더불어 심한 만성 설사와 혈성 설사를 일으킬 수 있으며, 완치가 힘들고 호전과 악화를 반복하는 특성이 있다. 궤양성 대장염은 대장의 점막에 진무름(미란)이나 궤양이 연속적으로 형성되는 질환으로, 혈변, 점혈변, 설사, 복통이 일어나고, 중증인 경우에는 발열, 체중감소, 빈혈 등의 전신성의 증상이 나타난다. 또한, 궤양성 대장염은 위장관 어느 부위에서도 발생할 수 있다. 크론병은 입에서 항문에 이르는 소화관의 임의의 부위에 궤양 등의 병변이 비연속적으로 발생하는 질환으로서, 복통, 설사, 혈변과 더불어, 중증의 경우에는 발열, 하혈, 체중감소, 전신권태감, 빈혈 등의 증상이 나타난다. 궤양성 대장염과 크론병은 병변과 염증 증상에 있어서 차이가 있지만 여러 면에서 유사한 양상을 보이기 때문에 두 질환의 구분이 서로 명확하지 않은 경우가 흔하다.

[0003] 종래, 궤양성 대장염 및 크론병의 발생율은 서양인에게 높다고 알려져 있었지만, 최근, 식습관 등의 생활습관의 변화로 인해 우리나라 등 동양에서도 환자수가 급증하고 있다. 그렇지만, 원인이 불분명한 이유도 있어 근본적 치료법은 확립되어 있지 않다. 이 때문에 완전한 치료를 목표로 하는 것이 아니라, 증상을 완해시키고, 이러한 상태를 가능한 한 장기간 유지하는 약제가 사용되고 있는 실정이다. 이러한 대증요법을 위한 약제로서, 주로 아미노살리실산제제, 부신피질 스테로이드제, 면역억제제 등이 사용되지만, 다양한 부작용이 보고되고 있다. 예를 들어, 아미노살리실산제제로서 자주 사용되는 살라조설파피리딘은 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통, 간장해, 백혈구 감소, 이상 적혈구, 단백뇨, 설사 등의 부작용이 보고되고 있다. 또한 부신피질스테로이드제는 일반적으로는 프레드니솔론의 경구투여, 관장, 좌약, 정맥 주사 등으로 사용되지만, 위궤양이나 장기사용에 의한 대퇴골두 괴사 등 부작용이 강하다. 그러나 투약의 중단은 증상을 재발시키기 때문에, 이들 약제는 계속적으로 사용하지 않을 수 없다. 따라서, 효과가 우수하면서도, 안전하고 부작용을 일으키지 않는 궤양성 대장염, 크론병 등의 장질환 치료제의 개발이 요구되고 있다. 과민성 대장염 증후군((irritable bowel syndrome, IBS)도 마찬가지로 그 원인이 명확하지 않은 만성 복부 질환이다. 현재, IBS의 근본적인 치료제는 존재하지 않으며, 각 타입의 증상 경감을 목적으로 한 대증요법이 행해지고 있다. 예를 들어, 하리형 IBS에 대해서는 평활근의 수축을 억제하는 진경작용을 갖는 항콜린제가 사용되며, 변비형 IBS에는 염류 하제, 대체형 IBS에는 약제로 조절하기 곤란하고, 기본적으로 소화관 운동기능 개선제가 사용되고 있다.

[0004] 한편, 산수유(山茱萸, Cornus fruit)는 산수유 나무(Cornus officinalis)의 열매이다. 산수유의 과육(果肉)에는 코르닌(cornin), 모로니사이드(Morroniside), 로가닌(Loganin), 탄닌(tannin), 사포닌(Saponin) 등의 배당체와 포도주산, 사과산, 주석산 등의 유기산이 함유되어 있고, 종자에는 팔미틴산, 올레인산, 리놀산 등이 함유되어 있다. 한방에서는 산수유를 통증, 요실금, 야뇨증 등의 치료에 사용하고 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-0845044호에는 산수유로부터 분리된 우르솔산(Ursolic acid)의 청각세포 보호 효과가 개시되어 있다. 그러나, 대장염 예방 또는 치료와 관련된 산수유의 효과는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 산수유 추출물 등의 신규 용도를 제공하는 것이고, 구체적으로 산수유 추출물 등의 대장염 예방 또는 치료에 관한 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 합성 화학물질에 비해 안전성이 확보된 수많은 천연물을 대상으로 대장염에 대한 예방 또는 치료 활성을 갖는 추출물을 개발하기 위하여 연구를 수행하였다. 그 결과, 산수유로부터 얻어진 추출물, 이의 분획물

또는 이로부터 분리된 화합물 등이 대장염 동물 모델에서 우수한 대장염 예방 또는 치료 활성을 가진다는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0007] 본 발명의 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물을 유효성분으로 포함하고, 상기 알코올은 탄소 수가 3 내지 8인 것을 특징으로 하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 우르솔산(Ursolic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 대장염 예방 또는 치료용 조성물은 바람직하게는 약학 조성물 또는 식품 조성물이다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 산수유 추출물, 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물 또는 산수유로부터 단리된 우르솔산(Ursolic acid) 등은 약학 조성물 또는 식품 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있고, 이러한 약학 조성물 또는 식품 조성물은 대장염, 특히 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 또는 과민성 대장염 증후군((irritable bowel syndrome, IBS)등을 효과적으로 예방, 지연, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 2는 만지페린(Mangiferin) 및 네오만지페린(Neomangiferin)의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 3은 우르솔산(Ursolic acid)의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 4는 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 제조예 2에서 얻은 오배자 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 4에서 "OBJ"는 오배자 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타낸다. 도 5는 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 제조예 5에서 얻은 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 5에서 "JM"은 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타낸다. 도 6는 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 제조예 8에서 얻은 산수유 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 6에서 "SSY"는 산수유 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타낸다. 도 7은 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)를 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 7에서 "PGG"는 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)를 나타낸다. 도 8은 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 만지페린(mangiferin)을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 8에서 "MF"는 만지페린(mangiferin)을 나타낸다. 도 9는 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 우르솔산(Ursolic acid)을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 9에서 "UA"는 우르솔산(Ursolic acid)을 나타낸다. 또한, 도 4 내지 9에서 "MEL"은 메살라진(Mesalazine)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0011] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0012] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 개선 행위를 의미한다.

[0013] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[0014] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명의 일 측면은 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 이하, 서술되는 내용에서 산수유 추출물은 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물 또는 우르솔산(Ursolic acid)으로 대체될 수 있다.

[0016] 본 발명에서 대장염은 세균 감염이나 장 내용물의 병적 발효 등으로 인해 대장에 염증이 발생한 상태를 말하며, 감염성 대장염과 비감염성 대장염을 포함하는 개념이다. 본 발명에 따른 산수유 추출물을 통해 예방 또는 치료가 가능한 구체적인 대장염의 종류는 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군 등이 있으나, 여기에 제한되는 것은 아니다. 염증성 대장 질환은 예를 들어 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 또는 크론병(Crohn's disease) 등이 있다. 또한, 본 발명에 따른 산수유 추출물을 통해 예방 또는 치료가 가능한 대장염은 급성 대장염과 만성 대장염 중 급성 대장염인 것이 바람직하다. 급성 대장염은 급성으로 오는 대장 또는 결장에의 염증을 말하는데, 염증으로 인해 점막이 손상되어 점액성 설사나 선혈 증상을 주로 보인다. 본 발명에서 급성 대장염은 일반적인 급성 감염성 대장염뿐만 아니라 급성 위막성 대장염 및 급성 궤양성 대장염을 포함한다. 본 발명에 따른 산수유 추출물은 2,4,6-트리니트로벤젠술폰산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)에 의해 유발된 대장염 동물 모델에서 대장의 외관을 양호하게 하고 결장의 수축을 억제하며, 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성을 낮게 유지시켜 대장염을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0017] 본 발명의 대장염 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 사용되는 산수유의 과육 또는 종자(씨앗) 등으로부터 추출될 수 있으며, 바람직하게는 종자(씨앗)으로부터 추출될 수 있다. 이때, 산수유 씨는 우르솔산(Ursolic acid)과 같은 활성 성분의 원활한 추출, 분리 및 정제를 위해 미리 오일 성분이 제거된 것이 바람직하다. 산수유 씨로부터 오일 성분을 제거하기 위해 공지의 탈지 방법 등을 사용할 수 있고, 예를 들어 헥산, 클로로포름, 벤젠과 같은 소수성 유기용매로 산수유 씨의 오일 성분을 추출하는 방법 등이 있다.

[0018] 본 발명의 대장염 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 산수유 추출물은 당업계에 공지된 통상의 추출 방법, 예를 들어 용매 추출법을 사용하여 제조될 수 있다. 용매 추출법을 이용한 산수유 추출물 제조시 사용되는 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올(예를 들면, 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올) 또는 이들의 혼합물인 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 디에틸에테르, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 이중 물, 알코올 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것이 바람직하다. 추출 용매로 물을 사용하는 경우 물은 열수인 것이 바람직하다. 또한, 추출 용매로 알코올을 사용하는 경우 알코올은 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올인 것이 바람직하고, 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올에서 선택되는 것이 더 바람직하다. 또한, 추출 용매로 함수 알코올을 사용하는 경우 알코올 함량은 50~90%인 것이 바람직하고, 60~80%인 것이 더 바람직하다. 한편, 본 발명의 산수유 추출물은 상기한 추출 용매뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다. 또한, 본 발명의 산수유 추출물은 상술한 추출 용매에 의한 추출물뿐만 아니라, 통상적인 다른 추출 방법을 통해 얻어진 추출물 내지 정제 및 발효 과정을 거친 추출물도 포함한다. 예컨대, 이산화탄소에 의한 감압, 고온에 의한 초임계 추출법에 의한 추출, 초음파를 이용한 추출법에 의한 추출, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의해 분리하거나 자연상태나 각종 미생물을 이용한 발효산물에 의한 추출물 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 및 추출방법을 통해 얻어진 활성 분획도 본 발명의 추출물에 포함된다. 상기 이산화탄소에 의한 감압, 고온에 의한 초임계 추출법에 의한 추출법은 초임계 유체 추출법(supercritical fluid extraction)을 의미하는 것으로, 일반적으로 초임계 유체는 기체가 고온 고압 조건에서 임계점에 도달하였을 때 갖는 액체 및 기체의 성질을 지니고 있으며, 화학적으로 비극성 용매와 유사한 극성을 지니고 있으며 이러한 특성으로 인해 초임계 유체는 지용성 물질의 추출에 사용되고 있다(J. Chromatogr. A. 1998;479:200-205). 이산화탄소는 초임계 유체기기의 작동으로 압력 및 온도가 임계점까지 이르는 과정을 거치면서 액체 및 기체 성질을 동시에 지닌 초임계 유체가 되고 그 결과 지용성 용질에 대한 용해도가 증가한다. 초임계 이산화탄소가 일정량의 시료를 함유한 추출 용기를 통과하게 되면 시료에 함유된 지용성 물질은 초임계 이산화탄소에 추출되어 나온다. 지용성 물질을 추출한 후 추출 용기에 남아있는 시료에 다시 소량의 공용매가 함유된 초임계 이산화탄소를 흘려 통과시키면 순수한 초임계 이산화탄소만으로는

추출되지 않았던 성분들이 추출되어 나오게 할 수 있다. 본 발명의 초임계추출법에 사용되는 초임계 유체는 초임계 이산화탄소 또는 이산화탄소에 추가적으로 공용매를 혼합한 혼합유체를 사용함으로써 효과적으로 유효 성분을 추출할 수 있다. 이러한 공용매는 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 대부분 이산화탄소를 함유하고 있는데 이산화탄소는 실온에서 공기 중으로 휘발되므로 상기 방법으로 얻은 추출물을 화장료 조성물로서 사용할 수 있으며, 공용매는 감압증발기로 제거할 수 있다. 또한, 상기 초음파 추출법은 초음파 진동에 의해 발생되는 에너지를 이용하는 추출방법으로, 초음파가 수용성 용매 속에서 시료에 포함된 불용성인 용매를 파괴시킬 수 있으며, 이때 발생되는 높은 국부온도로 인하여 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하기 때문에 반응에 필요한 충분한 에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격효과로 높은 압력을 유도하여 시료에 함유된 물질과 용매의 혼합 효과를 높여주어 추출효율을 증가시키게 된다. 초음파 추출법에 사용할 수 있는 추출용매는 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸 에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 진공 여과하여 여과액을 회수한 후 감압증발기로 제거하고, 동결 건조하는 통상의 추출물 제조방법을 통해 추출물을 얻을 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 산수유 추출물은 발효과정을 거친 추출물도 포함하는데, 산수유의 발효추출물은 다음과 같이 제조할 수 있다. 산수유를 100~500메쉬 정도로 미세하게 파쇄한 다음 통상적인 미생물 배양액을 1~50g/L를 첨가하고 효모균주 또는 유산균등의 미생물을 10,000~100,000 cfu/L의 양으로 첨가한다. 배양온도는 30~37℃의 통상적인 미생물 배양조건으로 배양한다. pH는 5~7로 호기적 또는 통상 혐기(anaerobic)적인 조건으로 약 5일 내지 10일간 배양한다. 이후 숙성 및 여과를 통해 얻을 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 산수유 추출물은 활성 물질로 우르솔산(Ursolic acid)을 포함한다. 다만, 상기 산수유 추출물의 활성 성분은 추출방법에 따라 구체적인 성분의 종류나 함량에 약간의 차이가 발생할 수 있다.

[0020] 본 발명의 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 조성물(특히 기능성 식품 조성물), 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있다.

[0021] 본 발명의 약학 조성물에서 산수유 추출물의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.1~99 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 산수유 추출물 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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. 또한, 본 발명의 대장염 예방 또는 치료용 조성물은 산수유 추출물 외에 대장염 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효 성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 산수유 추물물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 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, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 산수유 추출물을 기준으로 할 때 0.1 내지 1000 mg/kg인 것이 바람직하고, 1 내지 500 mg/kg

인 것이 더 바람직하며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[0022] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 식품 조성물에서 산수유 추출물의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~25 중량%, 더 바람직하게는 0.5~10 중량%이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 식품 조성물은 산수유 추출물 외에 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분들은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 사료 첨가제는 예를 들어 산수유 추출물 0.1 ~ 20 중량%, 지방분해효소(Lipase) 0.001 ~ 0.01 중량%, 제 3 인산칼슘 1 ~ 20 중량%, 비타민 E 0.01 ~ 0.1 중량%, 효소분말 1 ~ 10 중량%, 유산균 0.1 ~ 10 중량%, 바실러스(*Bacillus*) 배양액 0.01 ~ 10 중량% 및 포도당 20 ~ 90 중량%로 구성될 수 있으나, 특별히 이에 한정되는 것은 아니며, 산수유 추출물이 유효량으로 첨가되어 있다면, 본 발명의 사료첨가제로서 가능하다. 상기 유효량이란, 가금류, 가축 등이 꾸준히 섭취함으로써 우울증을 예방하거나 치료할 수 있는 양, 또는 대장염을 예방하거나 치료할 수 있는 양을 의미한다. 또한, 첨가에 의한 이익을 넘는 악영향이 생기지 않는 양이 바람직하다. 또한 상기 사료첨가제는 추가적으로 가금류 및 가축 등에 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 본 발명에 있어서는 상기 사료첨가제를 그대로 또는 공지의 담체, 안정제 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로서는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다. 본 발명의 사료첨가제를 공급하는 경우는 가금류 및 가축 등에 대하여 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 측면은 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 이때, 알코올은 탄소 수가 3 내지 8이고, 산수유 추출물의 활성 성분에 대한 가용성 및 가용화 후의 감압 농축 공정 등을 고려할 때 알코올의 탄소 수는 3 내지 6인 것이 바람직하고, 3 내지 5인 것이 더 바람직하고 4인 것이 가장 바람직하다. 본 발명에서 산수유 추출물의 가용화를 위해 사용되는 탄소 수 4의 알코올에는 n-부탄올, sec-부탄올, 이소부탄올, tert-부탄올 등이 있다. 본 발명에 따른 대장염 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 사용되는 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물은 산수유 추출물을 구성하는 성분들 중 탄소 수가 3 내지 8인 알코올에 가용 될 수 성분들로 이루어진 것으로서, 이 경우 산수유 추출물은 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출되는 것이 바람직하다. 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물은 예를 들어 물, 탄소 수가 1 내지 2인 알코올 또는 이들의 혼합물을 추출용매로 사용하여 산수유 추출물을 얻고, 여기에 물을 가하여 현탁시킨 후, 탄소 수가 3 내지 8인 알코올(예를 들어, 부탄올)을 첨가하고 분획하여 수득할 수 있다. 또한, 산수유 추출물의 알코올(예를 들어, 부탄올) 가용성 분획물은 우르솔산(Ursolic acid)을 포함한다. 또한, 산수유 추출물의 알코올 가용성 분획물을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 조성물(특히 기능성 식품 조성물), 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있고 조성물 내에서의 산수유 추출물의 알코올(예를 들어, 부탄올) 가용성 분획물의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 측면은 우르솔산(Ursolic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 대장염 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 사용되는 우르솔산(Ursolic acid)은 산수유, 산수유 추출물 또는 산수유 추출물의 유기용매 분획물 등으로부터 분리될 수 있으나, 여기에 제한되는 것은 아니며, 다양한 천연 자원으로부터 분리될 수 있다. 본 발명에 따른 대장염 또는 치료용 조성물은 우르솔산(Ursolic acid) 대신 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로

포함될 수 있으며, 약학적으로 허용가능한 염은 공지의 산성염, 염기성염 등을 포함한다. 또한, 우르솔산(Ursolic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 조성물(특히 기능성 식품 조성물), 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있고 조성물 내에서의 우르솔산(Ursolic acid)의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[0026] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0027] **1. 오배자 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물의 제조**

[0028] 제조예 1 : 오배자 추출물의 제조

[0029] 오배자 500 g에 80% 메탄올 수용액 2ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 동일한 용매 1ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하여 오배자 추출물 190g을 얻었다.

[0030] 제조예 2 : 오배자 추출물로부터 분획물의 제조

[0031] 제조예 1에서 얻은 오배자 추출물 190g을 물 1.5ℓ에 현탁한 후, 여기에 n-부탄올 1.5ℓ를 가하고 진탕 방치하여 n-부탄올 가용성 분획층과 물 가용성 분획층으로 분리하였다. n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 조건하에서 농축하여 n-부탄올 가용성 분획물 102g을 얻었다. n-부탄올 가용성 분획물의 수율은 오배자를 기준으로 할 때 21% 이상이었고, n-부탄올 가용성 분획물에 함유된 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)의 함량은 30% 이상이었다.

[0032] 제조예 3 : 오배자 추출물의 부탄올 가용성 분획물로부터 화합물의 분리

[0033] 제조예 2에서 얻은 n-부탄올 가용성 분획물 20g에 대하여 용출 용매(클로로포름:메탄올:물=65:35:10)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Merck, 10㎝×50㎝, 70~230 mesh)를 실시하여 5개의 소분획을 얻었다. 5개의 소분획 중 대장염 동물모델 시험에서 효과가 가장 우수했던 소분획인 Fr. Ⅳ를 메탄올로 재결정하여 미황색 분말 형태의 화합물을 얻었으며 ^{1}H-NMR(Bruker, AVANCE digital 400) 및 ^{13}C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 구조를 확인한 결과, 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)인 것으로 확인되었다. 도 1은 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

[0034] 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)의 수율은 오배자를 기준으로 할 때 2.6% 이상이었다.

[0035] ^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.12, 7.06, 7.00, 6.96 and 6.91 (each 2H, s, Gal H-2,6), 6.25 (1H, d, J = 8.3 Hz, Glc H-1), 5.92 (1H, t, J = 9.7 Hz, Glc H-4), 5.62 (1H, t, J = 9.7 Hz, Glc H-3), 5.57 (1H, dd, J = 9.7, 8.3 Hz, Glc H-2), 4.52 (1H, d, J = 10.5 Hz, Glc H-6), 4.38 (1H, d, J = 10.0 Hz, Glc H-5)

[0036] ^{13}C-NMR (500 MHz, CD_3OD) δ: 168.0. 167.4, 167.1, 167.0, 166.3, 146.7, 146.6, 146.5, 146.5, 146.3, 140.8, 140.3, 140.2, 140.1, 140.0, 139.9, 121.1, 120.4, 120.2, 120.2, 119.7, 110.6, 110.5, 110.4, 110.4, 110.3, 93.8 (Glc C-1), 74.4 (Glc C-5), 74.1 (Glc C-3), 72.2 (Glc C-2), 69.8 (Glc C-4), 63.1 (Glc C-6).

[0037] **2. 지모 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물의 제조**

[0038] 제조예 4 : 지모 추출물의 제조

[0039] 지모 500 g에 80% 메탄올 수용액 2ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 동일한 용매 1ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하여 지모 추출물 189g을 얻었다.

[0040] 제조예 5 : 지모 추출물로부터 분획물의 제조

[0041] 제조예 4에서 얻은 지모 추출물 189g을 물 1.5ℓ에 현탁한 후, 여기에 n-부탄올 1.5ℓ를 가하고 진탕 방치하여 n-부탄올 가용성 분획층과 물 가용성 분획층으로 분리하였다. n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 조건하에서 농축하여 n-부탄올 가용성 분획물 41g을 얻었다. n-부탄올 가용성 분획물의 수율은 지모를 기준으로 할 때 8.2% 이상이었고, n-부탄올 가용성 분획물에 함유된 만지페린(Mangiferin)의 함량은 10% 이상이었다.

[0042] 제조예 6 : 지모 추출물의 부탄올 가용성 분획물로부터 화합물의 분리

[0043] 제조예 5에서 얻은 n-부탄올 가용성 분획물 10g에 대하여 용출 용매(클로로포름:메탄올:물=65:35:10)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Merck, 10㎝×30㎝, 70~230 mesh)를 실시하여 9개의 소분획을 얻었다. 9개의 소분획 중 대장염 동물모델 시험에서 효과가 가장 우수했던 소분획인 Fr. Ⅶ에 대하여 25% 메탄올을 용출 용매로 MPLC(Medium pressure liquid chromatography; C_{18} reverse Merck, 3㎝×20㎝)를 실시하여 2개의 분획을 얻었다. 2개의 분획을 농축한 후 이를 각각 메탄올로 재결정하여 흰색 분말 형태의 화합물 2개를 얻었으며 질량분석 및 ^{13}C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 구조를 확인한 결과, 만지페린(Mangiferin)과 네오만지페린(Neomangiferin)인 것으로 확인되었다. 도 2는 만지페린(Mangiferin) 및 네오만지페린(Neomangiferin)의 화학구조식을 나타낸 것이다. 만지페린(Mangiferin) 및 네오만지페린(Neomangiferin)의 수율은 지모를 기준으로 할 때 각각 0.5% 이상 및 0.1% 이상이었다.

[0044] <만지페린>

[0045] ESI(-)-MS/MS 421, 301 $[M-Na]^-$

[0046] ^{13}C NMR (100 MHz) peaks : 162.254 (C-1), 108.04 (C-2), 164.295 (C-3), 93.813 (C-4), 103.088 (C-5), 154.606 (C-6), 144.228 (C-7), 108.489 (C-8), 179.551 (C-9), 156.697 (C-4a), 151.286 (C-4b), 112.128 (C-8a), 101.772 (C-8b), 82.025 (2-glc C-1’), 73.564 (C-2’), 71.103 (C-3’), 70.724 (C-4’), 79.449 (C-5’), 61.961 (C-6’).

[0047] <네오만지페린>

[0048] ESI(-)-MS/MS 421, 301 $[M-Na]^-$

[0049] ^{13}C NMR (100 MHz) 162.5 (C-1), 108.3 (C-2), 164. 5 (C-3), 94.0 (C-4), 103.3 (C-5), 156.9 (C-6), 144.4 (C-7), 112.4 (C-8), 179.8 (C-9), 154.7(C-4a), 151.5 (C-4b), 108.8 (C-8a), 102.0 (C-8b), 73.8 (2-glc C-1’), 71.3 (C-2’), 79.7 (C-3’), 71.0 (C-4’), 82.2 (C-5’), 61.4 (C-6’), 103.4 (7-glc C-1”) 73.5 (C-2”), 76.1 (C-3”), 69.6 (C-4”), 77.3 (C-5”), 60.7 (C-6”).

[0050] **3. 산수유 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화합물의 제조**

[0051] 제조예 7 : 산수유 추출물의 제조

[0052] 산수유 열매에서 과육을 제거하고 남은 씨 500 g에 헥산 3ℓ를 가하고 12시간씩 실온에서 3회 반복 추출하여 오

일 성분을 제거하였다. 헥산에 의해 오일 성분이 제거된 산수유 씨 에 80% 메탄올 수용액 2ℓ를 가하고 수욕 상에서 약 2시간 동안 추출한 후 여과하였다. 또한, 남은 잔사에 동일한 용매(즉, 80% 메탄올 수용액) 1ℓ를 가하고 동일한 조건에서 재추출한 후 여과하였다. 여과된 추출액을 감압 조건하에서 농축하여 산수유 추출물 70g을 얻었다.

[0053] 제조예 8 : 산수유 추출물로부터 분획물의 제조

[0054] 제조예 7에서 얻은 산수유 추출물 70g을 물 1.5ℓ에 현탁한 후, 여기에 1.5ℓ의 n-부탄올을 가하고 진탕 방치하여 n-부탄올 가용성 분획층과 물 가용성 분획층으로 분리하였다. n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 조건하에서 농축하여 n-부탄올 가용성 분획물 32g을 얻었다. n-부탄올 가용성 분획물의 수율은 산수유 씨를 기준으로 할 때 6.4% 이상이었고, n-부탄올 가용성 분획물에 함유된 우르솔산(Ursolic acid)의 함량은 10% 이상이었다.

[0055] 제조예 9 : 산수유 추출물의 부탄올 가용성 분획물로부터 화합물의 분리

[0056] 제조예 8에서 얻은 n-부탄올 가용성 분획물 32g에 대하여 용출 용매(클로로포름:메탄올:물=65:35:10)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Merck, 10㎝×50㎝, 70~230 mesh)를 실시하여 8개의 소분획을 얻었다. 8개의 소분획 중 대장염 동물모델 시험에서 효과가 가장 우수했던 소분획인 Fr. Ⅱ를 메탄올로 재결정하여 흰색 분말 형태의 화합물을 얻었으며 질량분석, ^{1}H-NMR(Bruker, AVANCE digital 400) 및 ^{13}C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 구조를 확인한 결과, 우르솔산(Ursolic acid)인 것으로 확인되었다. 도 3은 우르솔산(Ursolic acid)의 화학 구조식을 나타낸 것이다. 우르솔산(Ursolic acid)의 수율은 산수유 씨를 기준으로 할 때 0.35% 이상이었다.

[0057] EIMS m/z 456 $[M]^{+}$

[0058] ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ :5.5521(1H, pseudo-t, J=3.5Hz, H-12), 3.487(1H, dd, J=6.4Hz, 9.4Hz, H-3), 2.668(1H, d, J=11.5Hz, H-18), 2.356(1H, ddd, J=3.8, 5.7, 10.8Hz, H-11b), 2.149(1H, ddd, J=4.1, 13.6, 14.1, H-15a), 1.274(3H, s, H-27), 1.254(3H, s, H-23), 1.084(3H, s, H-25), 1.052(3H, s, H-26), 1.028(3H, d, J=6, H-29), 0.976(3H, d, J=6.5Hz, H-30), 0.913(3H, s, H-24)

[0059] ^{13}C-NMR(125 MHz, $CDCl_3$) δ : 180.3(s, C-28), 139.6(s, C-13), 126.0(d, C-12), 78.5(d, C-3), 56.2(d, C-5), 53.9(d, C-18), 48.4(s, C-9), 48.4(s, C-17), 42.9(s, C-14), 40.3(s, C-8), 39.9(s, C-4), 39.8(d, C-19), 39.8(d, C-20), 39.4(t, C-1), 37.8(t, C-22), 37.7(s, C-10), 33.9(t, C-7), 31.4(t, C-21), 29.2(q, C-23), 29.2(t, C-15), 28.5(t, C-2), 25.3(t, C-16), 24.3(q, C-29), 24.0(t, C-11), 21.8(q, C-30), 19.2(t, C-6), 17.9(q, C-29), 17.8(q, C-26), 17.0(q, C-24), 16.1(q, C-25).

[0060] **4. 대장염 동물 모델 실험을 통한 대장염 치료 효과**

[0061] (1) 실험동물의 준비

[0062] 4주령 ICR 수컷 생쥐(24-27g)를 오리엔트바이오㈜로부터 구입하였다. 모든 생쥐는 습도 50±10%, 온도 25±2℃의 조절된 환경 조건에서 사육하였으며 조명은 12시간 킨 후 12 시간 끄는 것을 반복하였다. 사료는 표준 실험용 사료(Samyang, Korea)를 사용하였으며 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험에서 한군은 6마리로 하였다.

[0063] (2) TNBS에 의한 대장염 유발 및 시료 투여

[0064] 실험동물 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 2,4,6-트리니트로벤젠술폰산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)으로 대장염을 유발하였다. 구체적으로 실험동물을 가볍게 에테르로 마취한 후 NBS(2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) 용액 2.5g을 50% 에탄올에 혼합한 용액을 끝이 둥근 1mℓ 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1mℓ 씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다. 반면, 정상군에는 생리식염수 0.1mℓ를 경구투여하였다. 이후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 시료를 생리

식염수에 녹여 미리 정한 용량대로 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식시켜 죽이고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하였다.

[0065] (3) 대장의 외관 분석 및 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[0066] 1) 외관 분석

[0067] 적출한 대장은 그 길이와 외관을 관찰하여 하기 표 1의 기준(Hollenbach 등, 2005 대장염 정도에 대한 기준)에 따라 점수로 매겼다. 이때 양성 대조군으로 메살라진(Mesalazine; Sigma) 투여군을 사용하였다. 또한, 장내 미생물 분석을 위해 대장 내용물의 일부를 채취하여 영하 80℃에서 냉동보관하였다. 대장 조직은 대장 내용물을 모두 제거하고, 생리 식염수에 세척한 후 일부는 병리조직용 샘플로 사용하기 위해 4% 포름알데히드 고정액으로 고정하였으며, 나머지는 분자생물학적 분석을 영하 80℃에서 냉동보관하였다.

표 1

[0068]

외관 점수	기준
0	어떠한 궤양과 염증도 발견되지 않음
1	출혈이 없는 궤양이 발견됨
2	궤양과 국소적인 출혈이 발견됨
3	한 곳에서만 궤양과 염증이 발견됨
4	궤양과 염증이 2곳 이상에서 발견됨
5	궤양이 2cm 이상으로 확대되어 있음

[0069] 2) MPO 활성 측정

[0070] 대장조직 100mg에 lysis buffer 200㎕를 넣고 균질화(homogenization) 하였다. 그 후 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻은 다음 Mouse MPO assay ELISA kit(Hbt HK210, USA)을 사용하여 MPO 활성을 측정하였다. 상층액 100㎕를 96 well plate에 넣은 다음 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100㎕의 희석된 tracer를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 각 well을 세척하였다. 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100㎕의 희석된 streptavidin-peroxidase conjugate를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 plate를 뒤집어 비운 다음 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 각 well을 세척하였다. 200㎕의 세척 완충용액을 사용하여 세척과정을 3회 반복한 다음 100㎕의 TMB substrate solution을 첨가하고 plate를 알루미늄 호일로 감싸 빛을 차단하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 그리고 100㎕의 정지 용액을 첨가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0071] 3) 대장의 외관 분석 및 MPO 활성 측정 결과

[0072] 하기 표 2 및 표 3은 대장의 외관 분석 및 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정 결과를 나타낸 것이다.

표 2

[0073]

TNBS 처리 및 경구투여 시료 정보	시료 투여 용량 (mg/kg)	Colon length (cm)	외관 점수 (Mean score)	MPO activity (μUnit/mg)
정상군 1	-	7.25±0.20	0.4±0.6	0.8±0.1
TNBS 처리군 1	-	3.31±0.39	3.8±0.2	7.0±0.9
TNBS 처리+오배자 추출물 투여군	20	5.21±0.38	2.1±0.52	2.1±0.4
TNBS 처리+오배자 분획물 투여군	10	5.24±0.36	1.8±0.44	1.8±0.5
TNBS 처리+오배자 분획물 투여군	20	5.75±0.17	1.7±0.5	1.2±0.7
TNBS 처리+지모 추출물 투여군	20	3.58±0.32	2.2±0.76	2.5±0.6
TNBS 처리+지모 분획물 투여군	10	4.58±0.32	1.8±0.76	2.4±0.2
TNBS 처리+지모 분획물 투여군	20	5.27±0.72	1.6±0.42	1.8±0.5
TNBS 처리+산수유 추출물 투여군	20	3.65±0.21	3.1±0.11	2.9±0.7

TNBS 처리+산수유 분획물 투여군	10	3.60±0.11	3.3±0.27	2.4±0.1
TNBS 처리+산수유 분획물 투여군	20	4.19±0.47	2.6±0.42	1.8±0.4
TNBS 처리+mesalazine 투여군 1	10	5.78±0.54	1.6±0.54	1.8±0.2

[0074] 상기 표 2에서 "오배자 추출물"은 제조예 1에서 얻은 것이고, "오배자 분획물"은 제조예 2에서 얻은 오배자 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타내고, "지모 추출물은 제조예 4에서 얻은 것이고, "지모 분획물"은 제조예 5에서 얻은 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타내고, "산수유 추출물"은 제조예 7에서 얻은 것이고, "산수유 분획물"은 제조예 8에서 얻은 산수유 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타낸다.

표 3

[0075]

TNBS 처리 및 경구투여 시료 정보	시료 투여 용량 (mg/kg)	Colon length (cm)	외관 점수 (Mean score)	MPO activity (μUnit/mg)
정상군 2	-	7.54±0.20	0.4±0.6	0.2±0.1
TNBS 처리군 2	-	4.36±0.41	3.9±0.2	2.3±0.4
TNBS 처리+PGG 투여군	5	7.12±0.35	1.4±0.22	0.2±0.1
TNBS 처리+PGG 투여군	10	7.14±0.17	1.4±0.55	0.2±0.1
TNBS 처리+mangiferin 투여군	10	5.81±0.09	2.7±0.45	0.5±0.2
TNBS 처리+mangiferin 투여군	20	6.98±0.21	1.7±0.27	0.2±0.2
TNBS 처리+neomangiferin 투여군	10	5.78±0.10	2.8±0.51	0.6±0.2
TNBS 처리+ursolic acid 투여군	10	5.12±0.45	2.7±0.45	0.5±0.1
TNBS 처리+ursolic acid 투여군	20	6.83±0.32	1.7±0.27	0.2±0.1
TNBS 처리+mesalazine 투여군 2	10	7.1±0.46	1.6±0.55	0.2±0.1

[0076] 상기 표 3에서 "PGG"는 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)를 나타낸다.

[0077] 표 2 및 표 3에서 보이는 바와 같이 오배자, 지모 및 산수유로부터 추출된 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 특정 화합물은 모두 대장염에 대해 우수한 예방 또는 치료 효과를 나타냈다.

[0078] (4) 염증 반응 지표 물질의 발현 억제 여부 분석

[0079] 1) IL-1 베타, IL-6 및 TNF-알파의 발현 억제 여부

[0080] 실험동물의 대장조직 100mg에 protease inhibitor cocktail이 함유된 250 ㎕의 RIPA buffer를 첨가하여 균질화 하였다. 그 후 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 영하 80℃에서 보관하면서 IL-1 베타, IL-6 및 TNF-알파의 발현량을 96-well ELISA plate kits(Pierce Biotechology, Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 하기 표 4 및 표 5는 IL-1 베타, IL-6 및 TNF-알파의 발현량 측정 결과를 나타낸 것이다.

표 4

[0081]

TNBS 처리 및 경구투여 시료 정보	시료 투여 용량 (mg/kg)	IL-1 베타 농도(pg/mg)	IL-6 농도 (pg/mg)	TNF-알파 농도 (pg/mg)
정상군 1	-	1.6±3.8	1.1±1.3	6.3±2.7
TNBS 처리군 1	-	120.0±28.7	17.5±3.9	193.8±43.3
TNBS 처리+오배자 추출물 투여군	20	37.2±8.2	4.5±1.6	43.2±4.9
TNBS 처리+오배자 분획물 투여군	10	18.5±10.9	3.1±1.3	32.0±9.7
TNBS 처리+오배자 분획물 투여군	20	6.4±4.3	1.6±2.0	13.9±8.3
TNBS 처리+지모 추출물 투여군	20	52.4±9.1	5.7±4.6	73.8±7.9
TNBS 처리+지모 분획물 투여군	10	44.4±28.7	4.9±0.4	61.0±16.3
TNBS 처리+지모 분획물 투여군	20	14.0±3.5	2.3±2.2	26.0±11.0
TNBS 처리+산수유 추출물 투여군	20	62.3±9.5	6.5±2.2	87.5±12.1
TNBS 처리+산수유 분획물 투여군	10	51.0±22.4	5.9±3.8	70.9±15.9
TNBS 처리+산수유 분획물 투여군	20	25.4±14.7	3.9±1.8	32.1±10.2
TNBS 처리+mesalazine 투여군 1	10	19.8±14.4	3.1±2.3	26.1±8.8

[0082] 상기 표 4에서 "오배자 추출물"은 제조예 1에서 얻은 것이고, "오배자 분획물"은 제조예 2에서 얻은 오배자 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타내고, "지모 추출물은 제조예 4에서 얻은 것이고, "지모 분획물"은 제조예 5에서 얻은 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타내고, "산수유 추출물"은 제조예 7에서 얻은 것이고, "산수유 분획물"은 제조예 8에서 얻은 산수유 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타낸다.

표 5

[0083]

TNBS 처리 및 경구투여 시료 정보	시료 투여 용량 (mg/kg)	IL-1 베타 농도(pg/mg)	IL-6 농도 (pg/mg)	TNF-알파 농도 (pg/mg)
정상군 2	-	17.4±2.1	0.9±0.6	20.1±8.9
TNBS 처리군 2	-	161.0±17.0	18.9±3.2	192.2±42.6
TNBS 처리+PGG 투여군	5	23.7±9.8	2.6±0.5	37.9±11.7
TNBS 처리+PGG 투여군	10	22.2±1.7	1.7±0.4	28.6±4.9
TNBS 처리+mangiferin 투여군	10	57.4±2.1	5.0±0.6	83.8±10.9
TNBS 처리+mangiferin 투여군	20	28.1±12.1	2.2±0.8	40.8±10.9
TNBS 처리+neomangiferin 투여군	10	62.2±5.1	6.9±1.2	93.6±9.2
TNBS 처리+ursolic acid 투여군	10	38.0±23.5	4.9±1.7	71.5±17.2
TNBS 처리+ursolic acid 투여군	20	28.1±12.1	2.5±1.0	41.0±12.7
TNBS 처리+mesalazine 투여군 2	10	31.1±2.9	2.9±1.2	52.9±5.7

[0084] 상기 표 5에서 "PGG"는 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)를 나타낸다.

[0085] 표 4 및 표 5에서 보이는 바와 같이 오배자, 지모 및 산수유로부터 추출된 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 특정 화합물을 투여한 실험동물군의 대장 조직에서 IL-1 베타, IL-6 및 TNF-알파의 발현이 유의적으로 억제되었다.

[0086] 2) COX-2, iNOS, p65(NF-카파B) 및 pp65(phosphor-NF-카파B)의 발현 억제 여부

[0087] 실험동물의 대장조직 0.3 g에 protease inhibitor cocktail이 함유된 1㎖의 RIPA buffer(Gibco사)를 첨가하여 균질화 하였다. 그 후 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 영하 80℃에서 보관하면서 COX-2, iNOS, p65(NF-카파B), pp65(phosphor-NF-카파B) 및 β-actin의 발현량을 Western blotting 방법으로 측정하였다. 먼저 상층액 50㎍을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀룰로스지에 100V, 400mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀로로스지를 5% skim milk로 30분간 blocking 한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율로 하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율로 하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하였다.

[0088] 도 4는 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 제조예 2에서 얻은 오배자 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 4에서 "OBJ"는 오배자 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타낸다. 도 5는 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 제조예 5에서 얻은 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 5에서 "JM"은 지모 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타낸다. 도 6는 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 제조예 8에서 얻은 산수유 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 6에서 "SSY"는 산수유 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물을 나타낸다. 도 7은 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)를 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 7에서 "PGG"는 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)를 나타낸다. 도 8은 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 만지페린(mangiferin)을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 8에서 "MF"는 만지페린(mangiferin)을 나타낸다. 도 9는 TNBS 처리에 의해 대장염을 유발한 후 우

르솔산(Ursolic acid)을 투여한 실험동물군의 대장에서 염증 반응 지표 물질의 발현이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 9에서 "UA"는 우르솔산(Ursolic acid)을 나타낸다. 또한, 도 4 내지 도 9에서 "MEL"은 메살라진(Mesalazine)을 나타낸다.

[0089] 도 4 내지 도 9에서 보이는 바와 오배자, 지모 및 산수유로부터 추출된 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 특정 화합물을 투여한 실험동물군의 대장 조직에서 COX-2, iNOS, p65(NF-카파B) 및 pp65(phosphor-NF-카파B)의 발현량이 크게 감소하였다.

[0090] **5. LPS 또는 PG로 유도한 대식세포의 염증반응에 대한 특정 화합물의 항염 효과**

[0091] 4주령 ICR 수컷 생쥐(20-28g)를 오리엔트바이오㈜로부터 구입하였다. 생쥐의 복강에 멸균된 4% thioglycolate를 2㎖를 투여하고, 96시간이 지난 뒤에 생쥐를 마취시키고, 다시 생쥐 복강에 RPMI 배지 8㎖를 투여하였다. 약 5~10분이 지난 뒤에 생쥐 복강 내의 RPMI(대식세포를 포함)를 다시 뽑아내고 1000 rpm의 조건에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 또한, 침전층에 새로운 RPMI를 넣어 가라앉은 세포를 2회 세척하였다. 이후, 새로운 배지를 다시 넣어 세포를 잘 현탁하고, hematocytometer를 이용하여 대식세포의 수를 카운트하였다. 24 well dish에 대식세포를 각 well당 0.5×10^6의 수로 깔고, 시험 물질과 염증 반응 유도 물질을 60분간 처리한 후 RIPA buffer (Gibco사)를 첨가하여 균질화 하였다. 이때, 시험 물질은 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose), 만지페린(mangiferin) 또는 우르솔산(Ursolic acid)에서 선택되었고, 염증 반응 유도 물질은 LPS(lipopolysaccharide) 또는 PG(peptidolgycan)에서 선택되었다. 이후, 균질화된 대식세포 샘플을 4℃ 및 13000 rpm의 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 영하 80℃에서 보관하면서 IRAK-1(Interleukin-1 receptor-associated kinase 1), p-IRAK-1(phosphor-Interleukin-1 receptor-associated kinase 1), p65(NF-카파B), pp65(phosphor-NF-카파B) 및 β-actin의 발현량을 Western blotting 방법으로 측정하였다. 먼저 상층액 50㎍을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀룰로스지에 100V, 400mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀로로스지를 5% skim milk로 30분간 blocking 한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율로 하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율로 하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하였다.

[0092] 도 10은 LPS(lipopolysaccharide)로 처리된 대식세포에서 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)에 의해 염증 반응이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 10에서 "PGG"는 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose)를 나타낸다. 도 11은 LPS(lipopolysaccharide) 또는 PG(peptidolgycan)로 처리된 대식세포에서 만지페린(mangiferin)에 의해 염증 반응이 억제되는 것을 나타낸 결과이다. 도 12는 LPS(lipopolysaccharide)로 처리된 대식세포에서 우르솔산(Ursolic acid)에 의해 염증 반응이 억제되는 것을 나타낸 결과이다.

[0093] 도 10 내지 도 12에서 보이는 바와 같이 오배자, 지모 및 산수유로부터 각각 분리된 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-β-D-글루코스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose), 만지페린(mangiferin) 및 우르솔산(Ursolic acid)은 우수한 항염증 효과를 나타내었다.

[0094] **6. 산수유 추출물을 포함하는 약학 조성물의 제조**

[0095] 하기의 약학 조성물의 제조에서 산수유 추출물은 산수유 추출물의 부탄올 가용성 분획물, 우르솔산(Ursolic acid)으로 대체가 가능하다.

[0096] <6-1> 산제의 제조

[0097] 제조예 7의 산수유 추출물 2 g

[0098] 유당 1 g

[0099] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0100] <6-2> 정제의 제조

[0101] 제조예 7의 산수유 추출물 100 mg

[0102] 옥수수전분 100 mg

[0103] 유 당 100 mg

[0104] 스테아린산 마그네 2 mg

[0105] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0106] <6-3> 캡슐제의 제조

[0107] 제조예 7의 산수유 추출물 100 mg

[0108] 옥수수전분 100 mg

[0109] 유 당 100 mg

[0110] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0111] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0112] <6-4> 환의 제조

[0113] 제조예 7의 산수유 추출물 1 g

[0114] 유당 1.5 g

[0115] 글리세린 1 g

[0116] 자일리톨 0.5 g

[0117] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0118] <6-5> 과립의 제조

[0119] 제조예 7의 산수유 추출물 150 mg

[0120] 대두추출물 50 mg

[0121] 포도당 200 mg

[0122] 전분 600 mg

[0123] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0124] <6-6> 주사제의 제조

[0125] 제조예 7의 산수유 추출물 100 mg

[0126] 소디움 메타비설파이트 3.0 mg

[0127] 메틸파라벤 0.8 mg

[0128] 프로필파라벤 0.1 mg

[0129] 주사용 멸균증류수 적량

[0130] 상기의 성분을 혼합한 후, 이중 2㎖를 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[0131] **7. 산수유 추출물을 포함하는 식품 조성물의 제조**

[0132] 하기의 식품 조성물의 제조에서 산수유 추출물은 산수유 추출물의 부탄올 가용성 분획물, 우르솔산(Ursolic acid)으로 대체가 가능하다.

[0133] <7-1> 밀가루 식품의 제조

[0134] 본 발명의 제조예 7의 산수유 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0135] <7-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0136] 본 발명의 제조예 7의 산수유 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0137] <7-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0138] 본 발명의 제조예 7의 산수유 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0139] <7-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0140] 본 발명의 제조예 7의 산수유 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0141] <7-5> 선식의 제조

[0142] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0143] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0144] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 제조예 7의 산수유 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0145] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0146] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0147] 제조예 7의 산수유 추출물(3 중량부),

[0148] 영지(0.5 중량부),

[0149] 지황(0.5 중량부)

[0150] <7-6> 건강음료의 제조

[0151] 액상과당(0.5g), 올리고당(2g), 설탕(2g), 식염(0.5g), 물(75g)과 같은 부재료와 본 발명의 제조예 7의 산수유 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0152] <7-7> 야채 주스의 제조

[0153] 본 발명의 제조예 7의 산수유 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0154] <7-8> 과일 주스의 제조

[0155] 본 발명의 제조예 7의 산수유 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖ 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

[0156] **8. 산수유 추출물을 포함하는 사료 첨가제의 제조**

[0157] 하기의 사료 첨가제의 제조에서 산수유 추출물은 산수유 추출물의 부탄올 가용성 분획물, 우르솔산(Ursolic acid)으로 대체가 가능하다.

[0158] <8-1> 사료 첨가제 1

[0159] 제조예 7의 산수유 추출물 0.1 ~ 20 중량부, 지방분해효소(Lipase) 0.001 ~ 0.01 중량부, 제 3 인산칼슘 1 ~ 20 중량부, 비타민 E 0.01 ~ 0.1 중량부, 효소 분말 1 ~ 10 중량부, 유산균 0.1 ~ 10 중량부, 바실러스(Bacillus) 배양액 0.01 ~ 10% 중량부 및 포도당 20 ~ 90 중량부를 배합하여 사료 첨가제를 제조하였다.

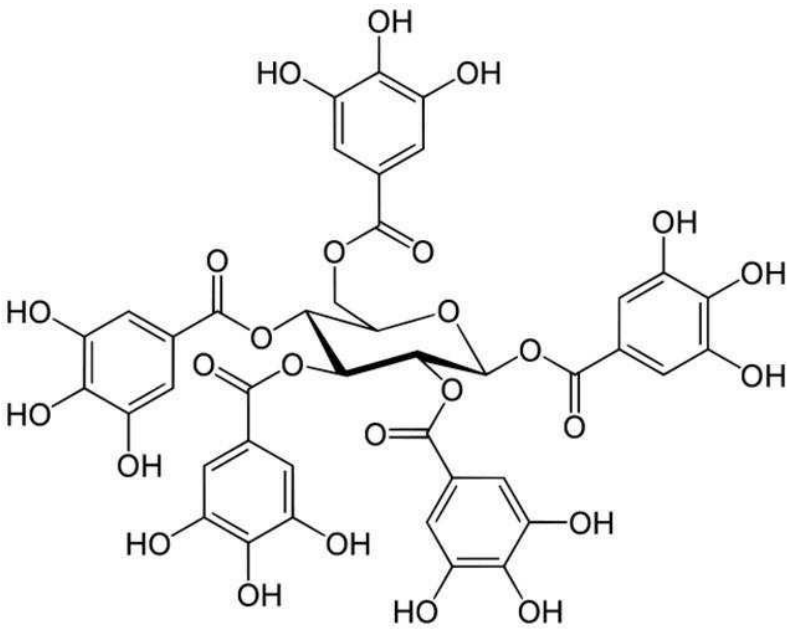
[0160] <8-2> 사료 첨가제 2

[0161] 제조예 7의 산수유 추출물 24 중량부, 어성초 추출 분말 24 중량부, 유산균 1 중량부, 효모 10 중량부, 초유 1 중량부, 포도당 20 중량부 및 알팔파 가루 20 중량부를 배합하여 사료 첨가제를 제조하였다.

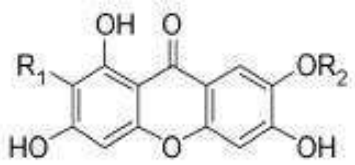
[0162] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 태양을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

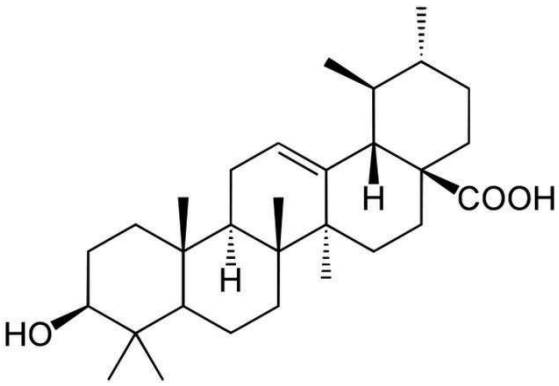


도면2

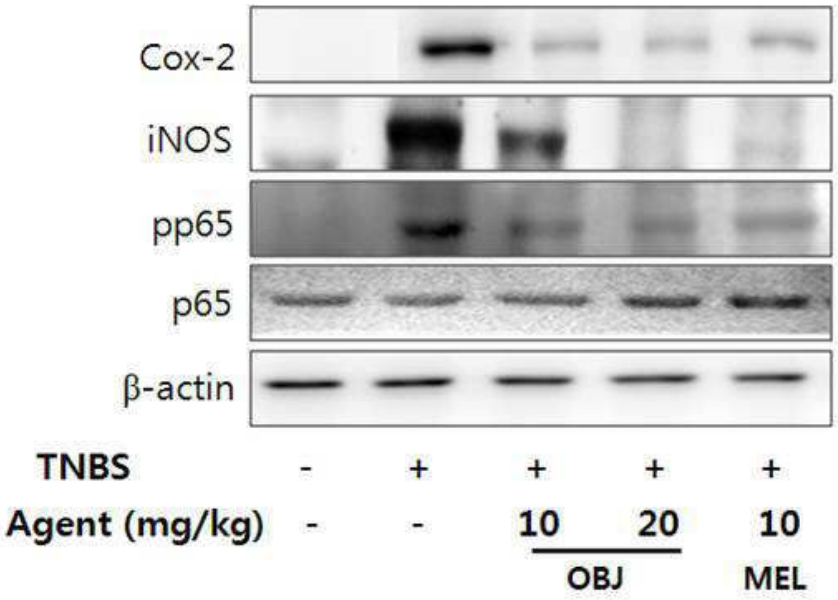


만지페린	R_1 = Glc R_2 = H
네오만지페린	R_1 = Glc R_2 = Glc

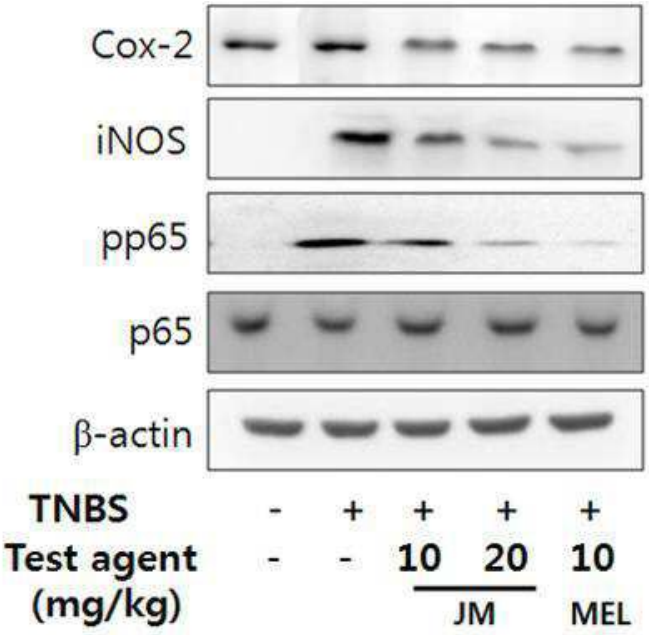
도면3



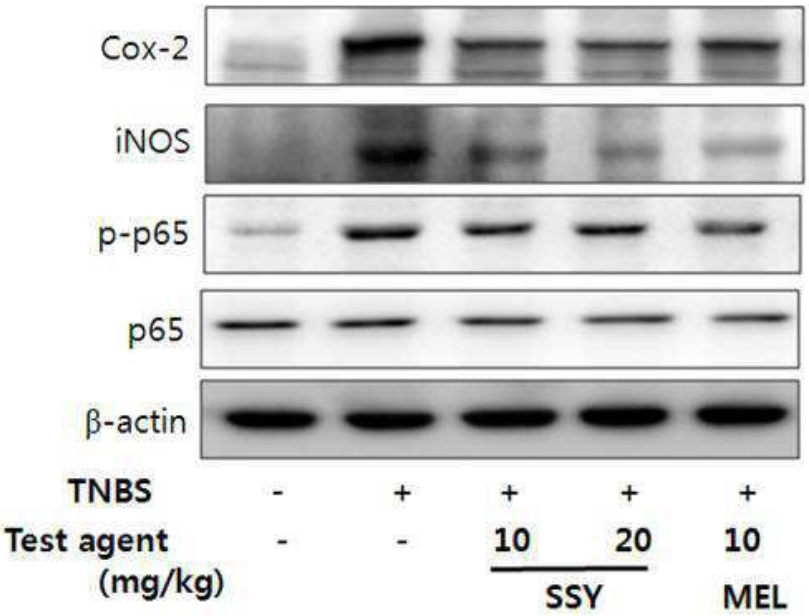
도면4


Cox-2
iNOS
pp65
p65
β-actin
TNBS - + + + +
Agent (mg/kg) - - 10 20 10
OBJ
MEL

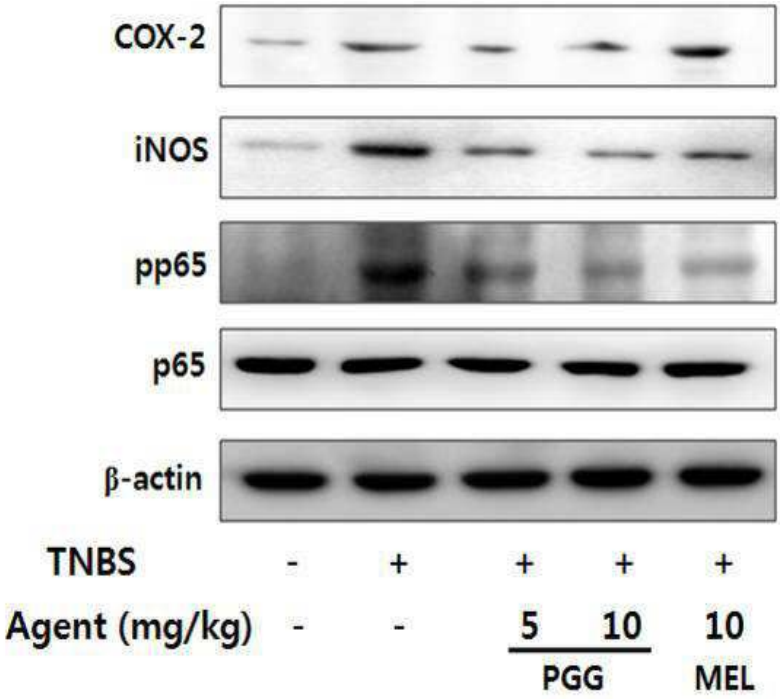
도면5


Cox-2
iNOS
pp65
p65
β-actin
TNBS - + + + +
Test agent (mg/kg) - - 10 20 10
JM
MEL

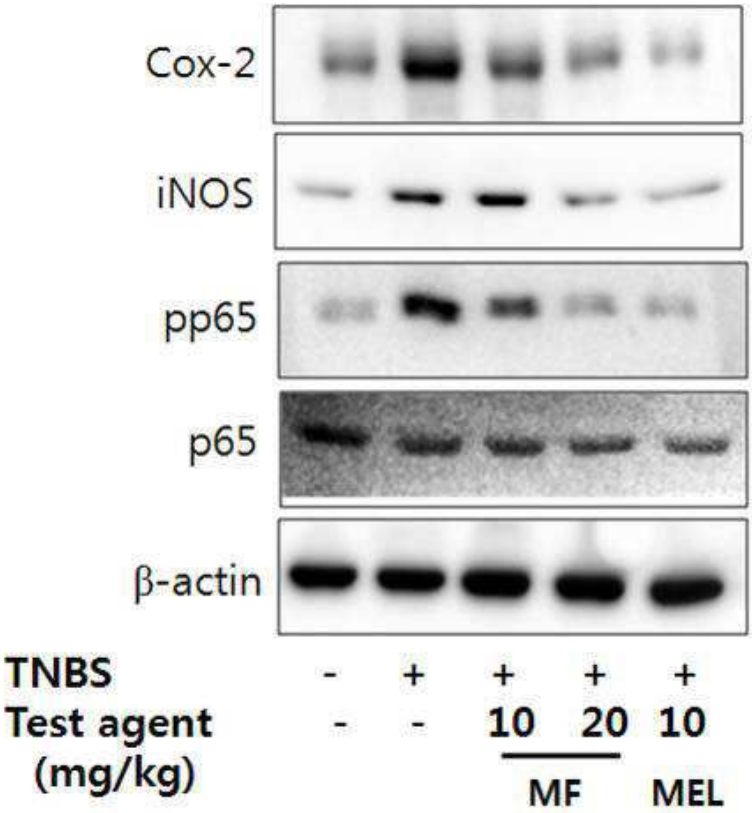
도면6


Cox-2
iNOS
p-p65
p65
β-actin
TNBS - + + + +
Test agent (mg/kg) - - 10 20 10
SSY
MEL

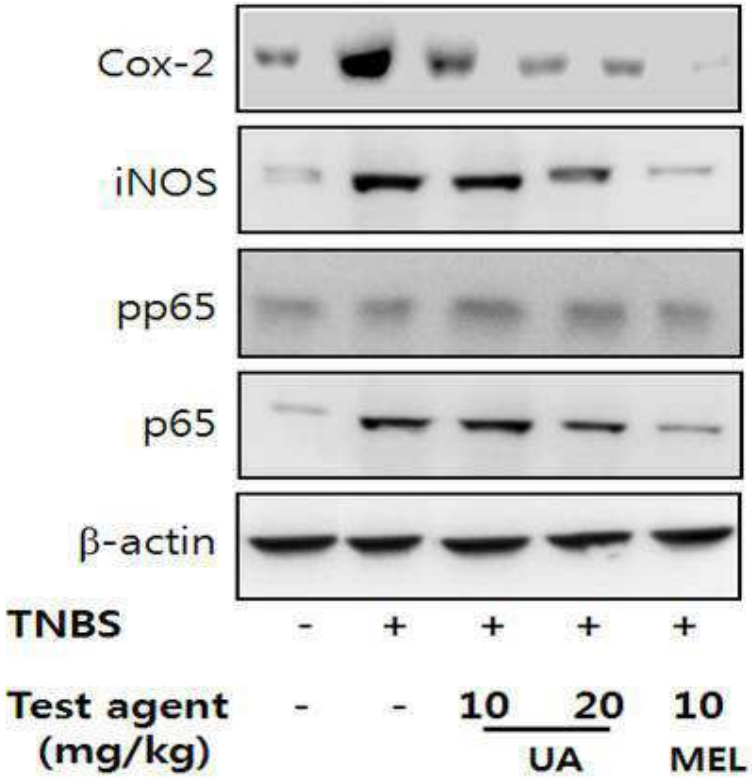
도면7


COX-2
iNOS
pp65
p65
β-actin
TNBS - + + + +
Agent (mg/kg) - - 5 10 10
PGG
MEL

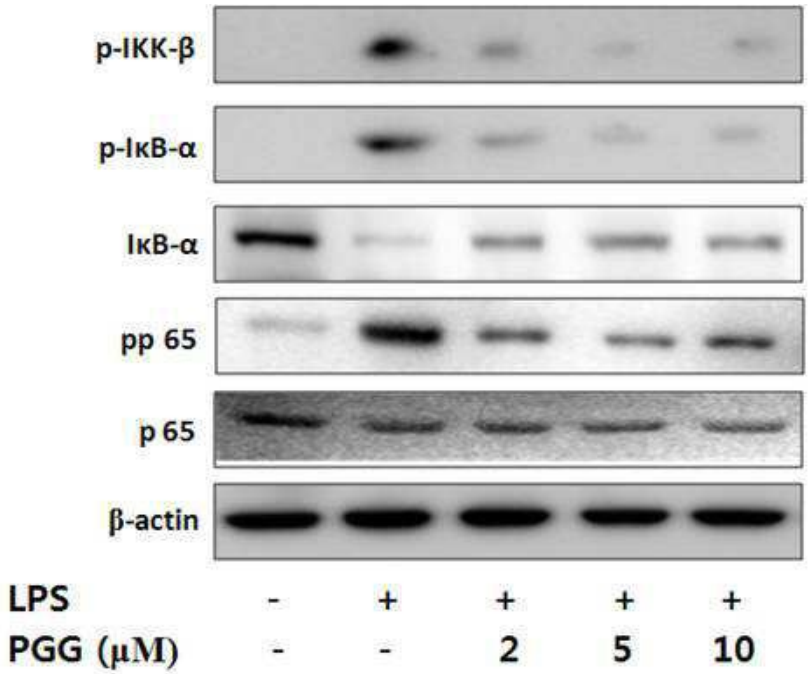
도면8


Cox-2
iNOS
pp65
p65
β-actin
TNBS - + + + +
Test agent - - 10 20 10
(mg/kg)
MF
MEL

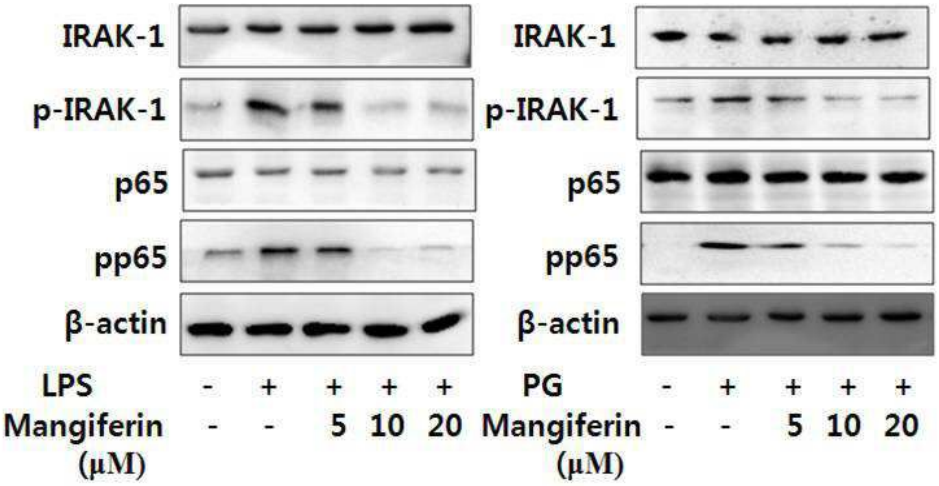
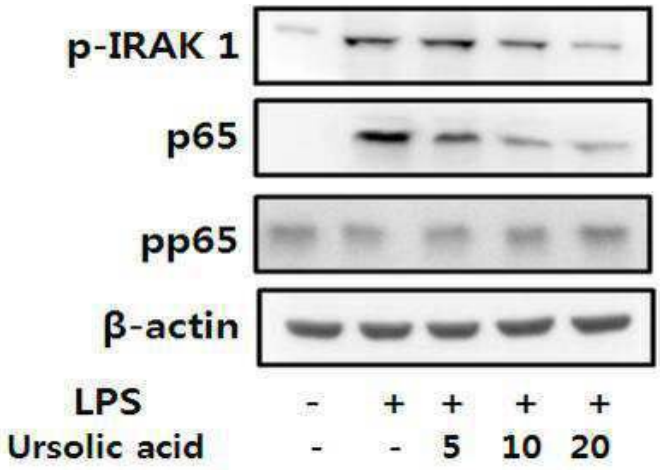
도면9


Cox-2
iNOS
pp65
p65
β-actin
TNBS - + + + +
Test agent - - 10 20 10
(mg/kg)
UA
MEL

도면10


p-IKK-β
p-IκB-α
IκB-α
pp 65
p 65
β-actin
LPS - + + + +
PGG (μM) - - 2 5 10

도면11


IRAK-1
p-IRAK-1
p65
pp65
β-actin
LPS - + + + +
Mangiferin (μM) - - 5 10 20
IRAK-1
p-IRAK-1
p65
pp65
β-actin
PG - + + + +
Mangiferin (μM) - - 5 10 20

도면12