



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년04월15일
(11) 등록번호 10-0821983
(24) 등록일자 2008년04월07일

(51) Int. Cl.

A61K 36/237 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0120714

(22) 출원일자 2006년12월01일

심사청구일자 2006년12월01일

(56) 선행기술조사문헌

Biol. Pharm. Bull., 2006, 29(7), 1423-1430*

Arch. Pharm. Res., 2006, 29(7), 548-555*

대한한의학회지, 2006, 27(1), 184-195*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

박동석

서울 송파구 문정2동 웨미리아파트 210동 1503호

유명철

서울 동대문구 이문동 346-73호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

전체 청구항 수 : 총 3 항

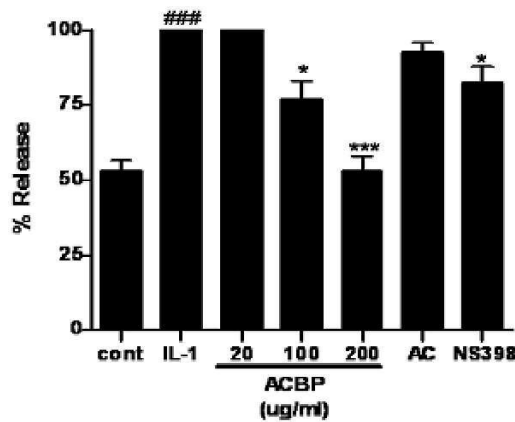
심사관 : 이민정

(54) 독활 및 화피 혼합 생약 추출물을 함유하는 관절염의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 독활 (*Aralia cordata* THUNB.) 및 화피(*Betula platyphylla* var. *japonica*) 혼합 생약 추출물을 함유하는 관절 연골 손상 또는 관절염의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 독활 및 화피 혼합물은 연골 구성물질의 분해 억제, 관절연골 보호 효과, 소염 및 진통 활성이 탁월하므로, 관절 연골 손상 또는 관절염의 예방 및 치료용 조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최도영

경기 광주시 오포읍 신현리 현대모닝사이드1차아파트 204동 1502호

이재동

서울특별시 동대문구 이문동 426번지
삼성래미안APT 204-1601호

백용현

서울 강남구 대치동 청실아파트 3동 1005호

허정은

서울 서대문구 연희동 712번지 14-6

조용백

경기 안양시 동안구 평촌동 꿈마을아파트 101동 1105호

한창균

서울 영등포구 신길동 삼성래미안 A 106동 1204호

이해인

경기 수원시 장안구 정자3동 현대아파트 597동 1203호

정기원

경기 수원시 장안구 정자2동 두견마을 한솔아파트 321동 1305호

특허청구의 범위

청구항 1

독활 및 화피의 혼합 건조 중량비가 0.1~10:1인 혼합 생약의 에탄올 추출물을 함유하는 관절염의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 관절염은 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염 또는 루푸스(Lupus) 관절염을 포함하는 약학조성물.

청구항 5

독활 및 화피의 혼합 건조 중량비가 0.1~10:1인 혼합 생약의 에탄올 추출물을 함유하는 관절염의 개선용 건강기능 식품.

청구항 6

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<11> 본 발명은 독활 및 화피 생약추출물을 함유하는 관절염 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

<12> 한의학에서 관절염은 주로 비증(痺證)으로 표현하는데 비증(痺證)의 임상표현은 주로 통증이며 통증은 병리적으로 기혈(氣血)순환의 문제로 야기될 수 있다. 주된 외적 요인은 풍(風), 한(寒), 습(濕), 열(熱) 등으로 구분할 수 있으며, 이러한 원인에 의해 관절, 근육 등의 기혈 순환 장애가 초래되고 통증이 나타나며, 심하면 관절의 운동범위의 제한이 나타난다. 내부적 요인으로는 장부(臟腑)중 간(肝)과 신(腎)에 주된 원인이 있는데, 근(筋)은 간(肝)에 속하며 간은 혈을 관장하며(肝藏血), 이것이 근골 관절을 자양(滋養)하여 간의 혈액을 조절하는 기능이 원활해야 어혈(瘀血)등 병리적 산물을 예방할 수 있다. 또한 신은 뼈를 관장하며(腎主骨) 인체의 정(精)기를 조절하는데 이 정(精)은 골수에 영양을 공급하고 골격을 자윤(滋潤)하는 기능을 한다. 따라서 관절의 이상은 간과 신의 기능과 밀접한 관련이 있어, 한의학에서 골관절염의 예방 및 치료는 이러한 원리를 바탕으로 하여 보다 근본적인 치료를 목표로 하고 있다. 대표적 골 관절 질환 중 하나인 퇴행성관절염은 만성 관절염이다. 난치성 질환으로서 현재 임상에서 사용되고 있는 항염증제 위주의 약물로는 완치가 어렵고, 또한 소화장애, 위장관 장애 및 신장기능 감소 등과 같은 전신적인 부작용을 유발하여 환자의 연령이 증가할수록 부작용 발생의 빈도가 높아져 노년층에 많은 골관절질환의 치료 시 장기간에 걸친 전신투여는 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 인구의 노령화에 비례하여 증가하는 퇴행성관절염에 항염증작용 등의 대중 요법적 접근보다는 좀더 적극적인 증상의 호전 및 예방을 위한 항염, 연골의 보호 및 재생효과를 목표로 한 신약의 개발이 그 어느 때보다 절실하다. 해외에서도 최근에는 항염증작용의 약물개발에서 한걸음 더 나아가 관절연골보호, 연골분해방지 및 재생촉진에 관심을 두고 관절조직분해효소 저해제, 자유라디칼 소거제(SOD등 활성산소류 제거효소), 관절조직구성성분(Chondroitin, Glucosamine etc.)의 장기 복용에 의한 보호 요법(conservation therapy) 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Badger, A.M., Cook, M.N., et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290, pp587-593, 1999; Choi, J.H., Choi, J.H., et al., *Osteoarthritis and*

Cartilage, 10, pp471-478, 2002). 이와는 별도로 최근에는 생약재를 이용한 관절염 치료제 개발이 활발하게 이루어지고 있으며 의약품 개발도 이루어지고 있으나 아직까지는 염증반응 억제에 주로 치중하여 개발되고 있는 실정이다. 이처럼 현재까지 개발되어 사용되고 있는 관절염 치료제의 대부분은 관절질환의 연골과 골조직을 보호 유지시키는데 주목하여 고안되었다기 보다는 오히려 염증반응을 억제시키는 것이었으며, 대부분의 경우는 미미한 치료 효과만을 나타내는 한계를 갖고 있었다.

<13> 한편 한국, 중국 및 일본 등의 동양권에서는 수천년에 걸친 임상적 평가로서 그 효능이 검증된 상기 질환 치료제가 사용되어져 왔으며, 민간에서도 나름대로의 비법이 전수되어 활용되고 있는 실정으로서, 이에 본 연구팀에서는 이러한 처방을 토대로 개발가능성이 있는 한약물을 선별하고 보다 엄밀한 기초 연구를 통해 그 기전을 규명함으로써, 신개념의 관절염 치료 한약물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

<14> 이들 각각의 생약들의 특성과 구체적인 작용을 살펴보면 다음과 같다.

<15> 독활 (獨活, *Aralia cordata* THUNB.)은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년생초본으로 높이는 1.2m에 달하며 줄기 곳곳에 짧은 털이 나 있다. 잎은 3~5장의 잔잎으로 된 겹잎으로 어긋나며, 잔잎 가장자리에는 톱니가 있다. 꽃은 연한 초록색으로, 암꽃과 수꽃이 따로 한 그루에 피는데, 7~8월에 가지 끝에 산형(傘形) 꽃차례로 핀다. 열매는 장과(漿果)로 10월에 검은색으로 익는다. 흔히 약으로 쓰기 위해 심기도 하는데, 한방에서 쓰는 독활은 봄과 가을에 뿌리줄기 및 뿌리를 캐서 겉껍질을 벗겨 햇볕에 말린 것으로 편두통 치료에 쓰인다. 뿌리를 캐자마자 바로 햇볕에 말리면 향기가 없어지므로 바람이 잘 통하는 그늘에서 어느 정도 말린 다음 햇볕에 말리는 것이 좋다. 맛은 맵고 성질은 따뜻하며 무독하며, 해열작용, 진통작용, 진경작용, 소염작용, 혈액응고 촉진작용, 강심작용, 강압작용 등의 효능이 있다. 민간에서는 진초를 해열제, 이뇨제 및 진통제로 사용한다. 약으로는 뿌리를 사용하는데 거풍제습, 통비지통의 효능이 있어 비증, 신경통, 두통, 중풍 후유증 등의 처방에 사용한다. 뿌리에는 정유 (essential oil)가 함유되어 있고, 정유 중에는 리모넨 (limonene), 사비넨 (sabinene), 알파-피넨 (α -pinene), 감마-테르피넨 (γ -terpinene), 미르센 (myrcene), 후물렌 (humulene, α -caryophyllene), 알파-코페인 (α -copaene), 테르피넨-4-올 (terpinene-4-ol)이 함유되어 있다 (정보섭 및 신민교저, 도해향약 대사전, 영림사, p435, 1998).

<16> 화피(樺皮)는 자작나무과에 속한 자작나무 및 만주자작나무의 껍질이다. 자작나무는 참나무목 자작나무과에 속하는 낙엽활엽교목으로, 높이는 20m에 달하고 수피는 흰색이며 수평으로 벗겨진다. 잎은 삼각 모양 달걀꼴이고 길이는 5~7cm로서 가장자리에 이 모양의 홀톱니 또는 겹톱니가 있다. 암수한그루로서 4~5월에 꽃이 피는데 암꽃은 위를 향하며 수꽃은 이삭처럼 아래로 늘어진다. 자작나무 껍질은 맛이 쓰고 성질이 차다. 간경에 작용하며 열을 내리고 습을 없애며 기침을 멈추고 담을 삭이는 작용이 있다. 해독작용도 탁월하고 이뇨작용이 있어서 신장염이나 부종을 고치는 데에도 쓸 수 있다. 한의학과 민간에서는 백화피, 화피 등으로 부르며 황달, 설사, 신장염, 폐결핵, 위염, 갖가지 용종 등의 치료에 이용해 왔다(신민교 외, 임상본초학, 영림사, 2000).

<17> 이에 본 발명자는 상기 혼합생약으로부터 이들 각각의 생약들의 특성과 효능을 최대한 살리고 관절염에 대한 치료효과 특히 관절보호효과를 극대화시키기 위하여 한방의 원리에 근거한 거풍습, 강근골, 활혈 및 조직 재생 촉진작용을 중심으로 100여종의 후보 생약을 선정하여 이를 바탕으로 관절염 치료에 대한 검증 실험을 거쳐 괄목한 만한 관절염 치료효과를 갖는 생약의 배합을 찾아내어 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<18> 본 발명은 탁월한 연골조직 보호효과, 소염 및 진통 효과를 갖는 독활 및 화피의 혼합생약추출물을 함유하는 관절염의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<19> 본 발명은 독활 및 화피 혼합생약추출물을 함유하는 관절염의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

<20> 상기 혼합생약추출물은 독활 및 화피의 혼합 건조 중량비가 0.1~ 10 : 1, 바람직하게는 0.5~ 5 : 1로 혼합된 것임을 특징으로 한다.

<21> 상기 추출물은 물 및 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 에탄올 및 물의 혼합용매, 보다 바람직하게는 40~ 60 % 에탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

<22> 상기 관절염은 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염 또는 루푸스(Lupus) 관절염을 포함한다.

- <23> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <24> 본 발명의 혼합생약추출물을 분리하는 방법을 설명하면, 독활 및 화피를 음건하여 마쇄한 후, 건조된 시료의 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 1 내지 10배 분량의 물 및 에탄올, 메탄올 등과 같은 C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.2 내지 1:5의 혼합부피 비를 갖는 물과 에탄올의 혼합용매, 바람직하게는 40 내지 60% 에탄올을 가하여 실온에서 약 0.5 내지 20시간, 바람직하게는 1 내지 10시간 동안 교반추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출 또는 초음파 추출, 바람직하게는 환류추출방법을 사용하여 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 건조하여 본 발명의 혼합생약추출물을 수득할 수 있다.
- <25> 본 발명은 상기 제조방법으로 얻어지는 독활 및 화피 혼합생약추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염 질환 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.
- <26> 본 발명의 관절염 질환 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 ~ 50 중량%로 포함한다.
- <27> 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- <28> 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 독활 및 화피 혼합물을 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 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출액에 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 액상 제제로는 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, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 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.
- <29> 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 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <30> 본 발명의 추출물은 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.
- <31> 본 발명은 독활 및 화피 혼합생약추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- <32> 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.
- <33> 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등이 있다.

- <34> 또한, 관절염의 예방 및 치료 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- <35> 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 혼합생약추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 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 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- <36> 상기 외에 본 발명의 추출물은 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 추출물은 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 중요하지 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- <37> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- <38> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <39> **실시예 1. 독활 및 화피 혼합생약추출물 제조**
- <40> 경희의료원 한방병원에서 구입한 독활 및 화피를 각각 600 g씩 약 0.5cm 정도의 크기로 세절하여 고루 섞은 후, 2 l의 50%(v/v) 에탄올을 가해 잘 교반하여 주면서 6 시간 환류 추출하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 1.5 l의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 3 시간 재 가온 추출한 후 여액을 모두 합하여 1 l로 농축 후, 동결 건조하여 분말상태의 독활 및 화피 혼합생약추출물 240g을 수득하였다 (이하 ACBP라 명명함).
- <41> **비교실시예 1. 독활추출물의 제조**
- <42> 경희의료원 한방병원에서 구입한 독활 600g을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 추출하여 독활 추출물 260g 수득하였다(이하 AC라 명명함).
- <43> **실험예 1. 진통 효과 측정**
- <44> 1-1. 족압 진통 실험 (Paw pressure analgesia test)
- <45> 본 발명의 ACBP의 진통효과를 알아보기 위해 족압 진통 실험 (paw pressure analgesia test)을 실시하였다 (Khasar SG et al., *Pain*, 116(1-2), pp79-86, 2005).
- <46> 실험동물로는 체중 200g의 웅성 SD 랫트 (중앙실험동물, Japan)를 수일간 순화시킨 후 사용하였다. AC (400 mg/kg), ACBP (400 mg/kg) 및 양성대조군인 COX-2 저해제 셀레콕시브 (100 mg/kg, Celecoxib, 한국화이자, USA)를 경구투여하고, 24시간 후 2 % 카라기난 (carrageenan, Sigma, USA)을 좌측 후지에 피하 투여하고 진통계측기 (analgesic meter, Stoelting, USA)를 사용하여 통증에 의한 회피 반응을 보일 때까지의 무게를 측정하였으며, 음성대조군의 무게를 기준으로 셀레콕시브의 효력을 100으로 하여 억제율을 환산하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	농도 (mg/kg)	부종억제율(%)
ACBP	400	133.6
AC	400	125.8
셀레콕시브 (celecoxib)	100	100

<47>

<48>

실험결과, 상기 표 1에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 ACBP가 단일 추출물 AC에 비하여 부종억제 효과가 증가하였고, 비스테로이드계 소염진통제인 셀레콕시브(celecoxib)보다 탁월하게 억제시켜, 진통효과의 우수함을 확인할 수 있었다.

<49>

1-2. 포르말린 진통 실험 (Formalin analgesia test)

<50>

본 발명의 ACBP의 진통효과를 알아보기 위해 포르말린 동물모델 실험을 실시하였다 (Fazli-Tabaei S et al., *Behav. Pharmacol.*, **16**, pp613-619, 2005).

<51>

실험동물로는 체중 20~ 25 g의 웅성 ICR 마우스 (중앙실험동물, Japan)를 수일간 순화시킨 후, 각 군당 10마리씩 사용하였다. AC (400 mg/kg), ACBP (400 mg/kg) 및 양성대조군인 COX-2 저해제 셀레콕시브 (100 mg/kg, Celecoxib, 한국화이자, USA)를 경구투여하고, 24시간 후 10 % 포르말린용액 (formalin, Sigma, USA)을 좌측 후지에 피하 투여하고 후지 바닥을 핥는 시간을 측정하여 셀레콕시브의 효력을 100으로 하여 억제율을 환산하여 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

구분	농도 (mg/kg)	통증 억제율(%)	
ACBP	400	1st	110.4
		2nd	110.1
AC	400	1st	106.3
		2nd	110.2
셀레콕시브	100	1st	100
		2nd	100

<52>

<53>

<54>

실험결과, 상기 표 2에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 ACBP가 단일 추출물 AC에 비하여 통증억제 효과가 증가하였고, 셀레콕시브와 비교시 비슷한 정도의 우수한 진통효과를 나타냄을 알 수 있었다.

<55>

1-3. 초산유도 진통 시험

<56>

본 발명의 ACBP의 진통 효과를 알아보기 위해 초산유도 진통시험을 실시하였다 (B.A. Whittle, *Brit. J. Pharmacol.*, **22**, pp246-253, 1964).

<57>

실험동물로 수컷 ICR 마우스(체중 20-25g)를 각 군당 10마리씩 사용하였다. AC (400 mg/kg), ACBP (400 mg/kg) 및 양성대조군인 COX-2 저해제 셀레콕시브 (100 mg/kg, Celecoxib, 한국화이자, USA)를 경구투여 후, 1시간 후에 0.7% 아세트산 (v/v in DW)을 복강 투여하여 통증을 유발하였다. 다음 5분 후부터 10분간 동물을 관찰하여 뒤틀림(writhing) 횟수를 기록 후, 음성대조군의 횟수를 셀레콕시브의 효력을 100으로 하여 억제율을 환산하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

구분	농도 (mg/kg)	뒤틀림 억제율(%)
ACBP	400	166.1
AC	400	142.1
셀레콕시브	100	100

실험 결과, 상기 표 3에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 ACBP가 단일 추출물인 AC에 비하여 통증억제 효과가 증가하였고, 셀레콕시브와 비교시 더 우수함을 알 수 있었다.

실험예 2. 소염효과 측정

2-1. 아라키돈산유발 귀부종 소염 실험 (Test with arachidonic acid - induced ear edema)

아라키돈산은 혈소판의 응고, 동맥경화, 심장병 및 염증 등을 일으키는 프로스타글란딘의 전구체로 염증을 발생시키는 주요한 원인이 되는 물질이다. 본 발명의 ACBP의 소염 활성을 평가하기 위해 아라키돈산 (arachidonic acid)으로 부종을 유발한 마우스를 이용하여 하기의 실험을 실시하였다(Lee JY et al., *Arch Pharm Res.*, 29(10) pp849-858, 2006).

실험동물로는 체중 20~ 30 g의 웅성 ICR 마우스 (중앙실험동물, USA)을 각 군당 6마리씩 사용하였다. AC (400 mg/kg), ACBP (400 mg/kg) 및 양성대조군인 COX-2 저해제 셀레콕시브 (100 mg/kg, Celecoxib, 한국화이자, USA)를 경구투여하고, 1시간 후에 아세톤으로 녹인 50 mg/ml의 아라키돈산을 마우스의 오른쪽 귀의 안쪽과 바깥쪽에 골고루 도포하여 귀의 부종을 유발하였다. 1시간 후 왼쪽 귀와 비교하여 귀두께의 증가율을 계산하여 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

구분	농도 (mg/kg)	부종 억제율(%)
ACBP	400	33.6
AC	400	25.9
셀레콕시브	100	20.5

실험 결과, 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 ACBP는 실험쥐에 유발된 귀의 부종에 대한 탁월한 소염효과를 나타내었고, 단일 추출물인 AC에 비하여 ACBP의 소염 효과가 증가하였다. 또한, 비스테로이드계 소염진통제인 셀레콕시브 보다 우수한 소염효과를 나타냄을 확인하였다.

2-2. 크로톤오일 유발 귀부종 소염 실험 (Test with croton oil - induced ear oedema)

크로톤 오일 (Croton oil)은 피부에 도포하면 도포면에 발적, 종창, 수포가 생기는 염증작용을 일으킨다. 본원발명의 ACE의 소염 활성을 평가하기 위해 크로톤 오일로 부종을 유발한 마우스를 이용하여 하기의 실험을 실시하였다(Cusan C et al., *Curr Drug Discov Technol*, 3(1), pp67-73, 2006).

실험동물로는 체중 20~ 30 g의 웅성 ICR 마우스 (중앙실험동물, Japan)을 각 군당 6마리씩 사용하였다. AC (400 mg/kg), ACBP (400 mg/kg) 및 양성대조군인 COX-2 저해제 셀레콕시브 (100 mg/kg, Celecoxib, Sigma, USA)를 경구투여하고, 1시간 후에 아세톤으로 녹인 2.5 %의 크로톤 오일을 마우스의 오른쪽 귀의 안쪽과 바깥쪽에 골고루 도포하여 귀의 부종을 유발하였다. 4시간 후 왼쪽 귀와 비교하여 귀두께의 증가율을 계산하여 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

구분	농도 (mg/kg)	부종 억제율 (%)
ACBP	400	33.7
AC	400	28.9
셀레코시브	100	25.5

실험결과, 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 ACBP는 실험쥐에 유발된 귀의 부종에 대한 우수한 소염효과를 나타내었고, 단일 추출물인 AC에 비하여 ACBP의 소염 효과가 증가하였다. 또한, 비스테로이드계 소염진통제인 셀레코시브보다 우수한 소염 효과를 나타냄을 확인하였다.

실험예 3. 연골보호 효과 측정

관절 연골은 물(70~80%), 콜라겐(10~15%), 프로테오글리칸(5~10%) 및 연골세포로 구성되어있으며, 프로테오글리칸은 한 줄의 중심단백(core protein)에 여러 개의 글리코스아미노글리칸(GAG; glycosaminoglycan)이 붙어있는 구조를 가지고 있다.

본 발명의 ACBP의 프로테오글리칸 분해억제 및 MMP-1 및 MMP-3 활성억제 효과를 확인하기 위하여 사람 및 토끼 관절 조직편 배양법을 이용하여 하기와 같은 방법으로 실험을 실시하였다(Cho YJ et al, *Biol Pharm Bull.*, 29(7), pp1408-1413, 2006; Kim JH et al., *J Pharmacol Sci.*, 98(3), pp298-306, 2005).

3-1. 실험 준비

3-1-1. 관절연골의 준비

사람의 관절연골은 인공관절 수술을 받는 환자의 샘플을 제공받아 사용하였으며 (경희의료원 정형외과 수술실), 토끼의 관절연골은 5주령 토끼 (Newzeland White Rabbit, 샘타코코리아, 대한민국)의 관절에서 채취하였으며, 연골세포는 2주령 토끼 (Newzeland White Rabbit, 샘타코코리아, 대한민국)의 관절에서 분리하였다.

3-1-2. 연골조직 배양

상기 실험예 3-1-1에서 수득한 사람 및 토끼의 관절연골을 열처리로 비활성화된 5 % 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, GIBCO BRL, USA)과 페니실린-스트렙토마이신 100 unit/ml이 함유된 기본배지 (DMEM; Dulbecco's modified eagle's medium, GIBCO BRL, USA)에 담가 놓았다. 관절 조직을 상기 배지로 수차례 씻어낸 다음 37 °C의 습한 95 % CO₂ 배양기에서 배양하였다. 1~ 2일 후 상기 배지를 열처리로 비활성화된 5 % 우태아혈청과 10 mM HEPES, 페니실린-스트렙토마이신 100 unit/ml이 함유된 기본 배지로 교체 하였고, 30 mg의 관절 조직을 48-웰 플레이트에 옮겼다. 1시간동안 배양 후, 인터루킨-1 α (IL-1 α , R&D system, USA) 5 ng/ μ l을 배지에 넣어 염증을 유발시키고, 본 발명의 ACBP를 각각 20, 100 및 200 ug/ml을 처리하고, 양성대조군 NS398(#N194, Sigma-aldrich, USA) 20 uM 및 AC 100 ug/ml을 처리 후, 37 °C에서 3일간 배양하였다. 3일간 배양 후 상등액을 수거하였으며, 이를 -20 °C에 보관하면서 하기 실험의 시료로 사용하였다.

3-2. 글리코스아미노글리칸(GAG) 분해정도 측정

본 발명의 ACBP의 관절 연골세포 보호효과를 측정하기 위해 프로테오글리칸을 구성하는 GAG의 분해억제 정도를 알아보는 하기와 같은 실험을 실시하였다 (French, M.M., et al., *Ann. Biomed. Eng.* 32, pp50-56, 2004).

배지 중 GAG 수치는 1,9-디메틸메틸렌블루와 반응한 다 음이온성(polyanionic)물질의 양에 의해 측정하였으며, 표준물질로는 황산콘드로이틴(chondroitin sulfate)을 사용하였다. 540 nm에서 분광학적 GAG량을 측정하였고, 인터루킨 1 α 로 유도된 GAG 분해량을 기준으로 억제율을 계산하여 나타내었다.

실험결과, 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 사람 및 토끼 관절 조직 배지중의 GAG 분해정도에서 본 발명의 ACBP는 연골세포 분해를 농도에 의존적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 양성대조군으로 사용한 COX-2 억제제인 NS398처리군의 경우 20 uM에서 GAG 분해를 억제하지 못하였으나 AC처리군은 100 ug/ml에서 GAG 분해를 억제하였다.

<85> 따라서 본 발명의 ACPB는 AC 단일추출물에 비하여 GAG 분해 억제 효과가 증가하였고 NS398보다 우수한 연골보호 효과가 있음을 알 수 있었다.

<86> 3-3. MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 활성 억제 시험

<87> MMP (Matrix metalloproteinase)는 연골조직의 단백질을 파괴하는 단백질 분해효소의 일종으로 류마티스 관절염은 물론 골관절염에서 연골조직을 파괴하여 관절염을 악화시키는 역할을 하므로 이들의 생산을 억제하는 것은 관절의 연골보호 측면에서 특히 중요하다(Dean, D.D. et al., *J. Clin. Invest.*, **84**, pp678-685, 1989).

<88> 본 발명의 ACPB의 MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 활성 억제 알아보는 위하여 상기 실시예 3-1-2에서 얻어진 토끼와 사람의 연골조직 배양액을 이용하여 하기와 같은 방법으로 실험을 실시하였다.

<89> 배지에서의 MMP 활성 수치는 ELISA 키트(Biomol Research Lab., Inc., PA, USA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 간단히 설명하면, MMP 활성은 스트로미에린(stromyelin)-1/ MMP-3 및 콜라게나아제(collagenase)-3/ MMP-13에 의해 잘려지는 표색 기질(colorimetric substrate)로써 티오펩티라이드(thiopeptolide; Ac-Pro-Leu-Gly-[2-mercapto-4-methyl-pentanol]-Leu-Gly-OC₂H₅)를 사용하여 측정하였다. 프로테라이트(Protelytic) 활성을 측정하기 위해 각 시료를 25 μ L씩 96 웰 플레이트에 효소와 함께 분주하였으며, 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 450 nm에서 측정하였다. 각 시료의 MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 활성은 각 배지 웰에 들어있는 MMP의 %로 측정하였다.

<90> 실험결과, 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 ACPB는 토끼의 연골조직에서 인터루킨-1 α 로 유도된 단백질 분해효소 MMP-1 및 MMP-3의 활성을 농도 의존적으로 유의하게 억제시켰고, AC 추출물에 비하여 억제 효과가 우수하였다. 또한 양성대조군으로 사용한 COX-2 억제제인 NS398 처리군의 경우, MMP-1의 활성을 거의 억제시키지 못하였다. 따라서 ACPB는 NS398에 비하여 더 탁월한 MMP 분해억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

<91> 또한, 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 ACPB는 사람의 연골조직에서 인터루킨-1 α 로 유도된 단백질 분해효소 MMP-1 및 MMP-13의 활성을 농도 의존적으로 유의하게 억제시켰고, AC 추출물에 비하여 억제 효과가 우수하였다. 또한 양성대조군으로 사용한 COX-2 억제제인 NS398 처리군의 경우, MMP-1의 활성을 억제시키지 못하였다. 따라서 본 발명의 ACPB는 관절연골 보호에 탁월한 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

<92> 3-4. 세포독성 측정

<93> 본 발명의 ACPB가 연골세포의 생존능력에 미치는 영향을 확인하기 위하여 연골세포를 이용하여 MTT 분석(assay)(Mosmann T et al., *J immunol Methods.*, **65**, pp55-63, 1983)로 실험을 실시하였다.

<94> 1일간 배양한 플레이트에 methylthiazol tetrazolium (MTT) 용액 (M2003, Sigma-aldrich, USA)을 10 μ L씩 분주하고 37°C에서 2시간 동안 배양(incubation)한 후 450 nm에서 (650 nm까지 가능) 흡광도를 측정한다.

<95> 실험결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 ACPB는 고농도 (800 μ g/ml) 처리 후 1일간 배양액에서도 콘드로사이트 생존에 영향을 미치지 않으므로, 연골세포에 세포독성을 나타내지 않아 안전한 조성물임을 확인할 수 있었다.

<96> 실험예 4. 콜라게나아제 유도 골관절염 동물 모델 (CIA model; Collagenase-induced osteoarthritis model)에서의 연골보호 효과

<97> 4-1. 실험 준비

<98> 토끼 (Newzeland White Rabbit, 샘타코, 대한민국)는 1주 동안 순화시켜 사용하였다. 토끼의 우측 무릎 활액 (synovia) 내에 4 mg/ml 콜라게나아제 (collagenase, Sigma, USA)를 0.25 ml 투여하였다. 콜라게나아제 주사전 체중을 재고, 1주일 간격으로 4주간 체중의 변화를 정량하였다. 음성대조군 (n=8)에는 0.5 % 카르복시 메틸셀룰로스 (carboxymethyl cellulose; CMC)를 20 ml/day, 실험군에는 ACPB를 20 ml/day (200 mg/kg) 및 양성대조군으로 셀레콕시브(CEX)를 (100 mg/kg) 4주간 경구 투여하였다. 4주 후 각 토끼의 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였으며, 우측 무릎(n=4)을 잘라내어 단백질을 분리하였고, 나머지 토끼의 우측 무릎(n=4)은 10 % 포르말린 용액으로 고정하였다.

<99> 4-2. 육안적 관찰

상기 실험에 4-1의 CIA 동물 모델에서 4주간 체중의 변화를 관찰한 결과, 콜라젠에이즈 주사 후 7일째에 약 0.4 kg 감소하였고, ACBP 투여군에서는 14일째에 정상군과 동등정도로 체중이 회복된 반면, CEX 투여군에서는 체중이 회복되지 않았다 (표 6 참조).

표 6

	정상군 (mean/kg)	0.5% CMC (mean/kg)	ACBP (mean/kg)	CEX (mean/kg)
0 day	3.05	3.04	3.05	3.04
7 day	3.09	2.66	2.78	2.68
14 day	3.15	2.45	3.01	2.79
21 day	3.20	2.81	3.11	2.84
28 day	3.25	2.97	3.24	2.98

4-3. 시클로옥시게나제-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 활성 측정

상기 실험에 4-1의 CIA 동물 모델에서 4주째에 분리한 혈청을 효소면역측정키트 (EIA kit; Enzyme immunoassay kit, #760151, Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA)에 적용하여 시클로옥시게나제 활성을 측정하였다 (Seaver B and smith JR, *J. Herb Pharmacother.*, 4, pp11-18, 2004).

혈청을 인산완충용액을 사용하여 1:50으로 희석하여 50 μ l씩 분주하고 COX-2 억제제인 DuP-697 (Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) 또는 COX-1 억제제인 SC-560 (Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA)을 50 μ l씩 첨가하여 반응시켜, 혈청 내에 존재하는 COX-1 또는 COX-2의 활성을 억제시킴으로써 이에 상응하는 COX-1 또는 COX-2의 활성을 발색법으로 측정하여 하기 도 8에 나타내었다.

실험결과, 본 발명의 ACBP는 COX-1의 활성은 억제하지 않았고 COX-2 활성만을 선택적으로 억제하였다. 따라서, ACBP가 위점막 및 장에 존재하는 내적인 COX-1의 활성은 억제하지 않으며, 염증 및 통증 등을 선택적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

4-4. 프로스타글란딘 E2 (Prostaglandin E2; PGE2) 활성 측정

상기 실험에 4-1의 CIA 동물 모델에서 관절연골 내의 PGE2의 양을 PGE2 효소면역측정 키트 (PGE2 EIA kit, Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA)를 이용하여 측정하였다 (Dovedi SJ et al., *J. Urol.*, 174(1), pp332-337, 2005).

혈청을 인산완충용액을 사용하여 1: 50으로 희석하여 50 μ l씩 분주하고, 염소 항-마우스 PGE2 단클론 IgG 항체 (goat anti-mouse prostaglandin E2 monoclonal IgG)가 미리 코팅된 플레이트 (pre-coated plate)를 사용하여 발색시켰고, 합성된 PGE2 (synthesized PGE2)의 양은 표준 (standard) PGE2를 순차적으로 희석 (serial dilution)하여 측정 후, 정량화하여 도 9에 나타내었다.

실험 결과, 본 발명의 ACBP는 PGE2의 활성을 억제시켰으며, 따라서 ACBP의 항염 효과 및 진통 기전을 확인하였다.

4-5. 조직학적 염색 (histological staining)에 의한 연골 조직 회복 측정

조직화학적 염색을 위해 상기 실험에 4-1에서 수득한 CIA 동물 모델의 무릎관절을 10 % 포르말린 고정액으로 고정하고, 칼슘을 제거한 후, 파라핀으로 포매하였다. 파라핀 블록을 5 μ m 두께로 절편화하여 라이신이 코팅된 슬라이드 (poly-L-lysine-coated glass slide, Sigma, USA)에 접착시켰다. 절편은 탈파라핀 과정 후 합수과정을 거쳐 헤마톡실린 및 에오신 (Hematoxylin & Eosin)으로 염색하였다 (Nicholson et al., *Eur J Molphol*, 42(4-5), pp 178-184, 2005).

실험결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, CIA 동물모델인 토끼의 연골층이 매우 얇아져 있었으나 (도 10b(100x) 및 도 10e(400x)), ACBP를 투여한 토끼의 관절은 (도 10c(100x) 및 도 10f(400x)) 손상된 연골층이 정상군 (도 10a(100x) 및 도 10d(400x))와 비슷하게 회복되었다.

상기 실험결과를 키쿠치 등 (Kikuchi et al., *Osteoarthritis*, 4, pp99-110, 1996)의 방법을 이용하여 각각을 점수로 환산, 등급화하여 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

	CMC 처리군	ACBP 처리군 (200 mg/kg)
연골의 경골 고원부 (Tibial plateau of cartilage)		
loss of superficial layer	4.7 ± 0.9	2.4 ± 0.6
erosion of cartilage	4.9 ± 1.2	2.7 ± 1.1
fibrillation and/or fissures	3.8 ± 0.7	2.5 ± 1.9
disorganization of chondrocytes	4.1 ± 1.1	1.3 ± 0.8
loss of chondrocytes	3.5 ± 0.8	1.4 ± 0.9
cluster formation	3.7 ± 1.4	1.7 ± 1.5
Sumscore	24.7 ± 6.1	11.9 ± 7.5
Each data represents the mean±S.D. (n=5) *P<0.01 compared to 0.5 % CMC treated group.		

실험결과, ACBP 투여군의 경우, 0.5 % CMC를 투여한 대조군에 비하여 연골표면의 손상, 연골함몰, 찢개짐 및 연골세포의 분포 등의 점수 총 합계가 약 2.4 낮게 나타났으며, 이는 연골조직 및 연골세포의 회복을 나타내는 결과이다.

실험예 5. 경구투여 독성실험

4주령의 특정병원성부재 (SPF)의 ICR 마우스 (중양실험동물, Japan)를 사용하여 급성 및 반복독성실험을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다(Zhang Z et al., *International Journal of Toxicology*, 25(4), pp285-294, 2006).

각 군 (5마리/군)에 본 발명의 ACBP를 용해시켜 5g/kg/10ml의 용량으로 단회 경구 투여하였다. ACBP를 투여한 후, 동물의 폐사 여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다. 반복투여 독성실험의 경우, 2g/kg/10ml의 용량으로 5회 반복 경구 투여하였다.

실험결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중 변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 발명의 ACBP는 모든 마우스에서 5,000 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않으며 경구 투여 최소 치사량 (LD50)은 5,000 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

하기에 본 발명의 추출물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

제제예 1. 산제의 제조

ACBP	20 mg
유당	100 mg
탈크	10 mg

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

제제예 2. 정제의 제조

ACBP	10 mg
------	-------

<129>	옥수수전분	100 mg
<130>	유당	100 mg
<131>	스테아린산 마그네슘	2 mg

<132> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<133> **제제예 3. 캡슐제의 제조**

<134>	ACBP	10 mg
<135>	결정성 셀룰로오스	3 mg
<136>	락토오스	14.8 mg
<137>	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

<138> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<139> **제제예 4. 주사제의 제조**

<140>	ACBP	10 mg
<141>	만니톨	180 mg
<142>	주사용 멸균 증류수	2974 mg
<143>	Na2HPO4, 12H2O	26 mg

<144> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<145> **제제예 5. 액제의 제조**

<146>	ACBP	20 mg
<147>	이성화당	10 g
<148>	만니톨	5 g
<149>	정제수	적량

<150> 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.

<151> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<152>	ACBP	1000 mg
<153>	비타민 혼합물	적량
<154>	비타민 A 아세테이트	70 μ g
<155>	비타민 E	1.0 mg
<156>	비타민 B1	0.13 mg
<157>	비타민 B2	0.15 mg
<158>	비타민 B6	0.5 mg
<159>	비타민 B12	0.2 μ g
<160>	비타민 C	10 mg
<161>	비오틴	10 μ g
<162>	니코틴산아미드	1.7 mg

<163>	엽산	50 μ g
<164>	판토텐산 칼슘	0.5 mg
<165>	무기질 혼합물	적량
<166>	황산제1철	1.75 mg
<167>	산화아연	0.82 mg
<168>	탄산마그네슘	25.3 mg
<169>	제1인산칼륨	15 mg
<170>	제2인산칼슘	55 mg
<171>	구연산칼륨	90 mg
<172>	탄산칼슘	100 mg
<173>	염화마그네슘	24.8 mg

<174> 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.

<175> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<176>	ACBP	1000 mg
<177>	구연산	1000 mg
<178>	올리고당	100 g
<179>	매실농축액	2 g
<180>	타우린	1 g
<181>	정제수를 가하여	전체 900 ml

<182> 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.

<183> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

발명의 효과

<184> 본 발명의 독활 및 화피 혼합생약추출물은 시험관 내 실험 및 생체내 실험에서 연골 구성물질의 분해 억제 및 관절연골 보호 효과를 나타내며, 생체내 실험인 염증 및 통증 유발 동물에서 소염 및 진통 활성이 탁월하므로, 연골손상 또는 관절염의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 유용하게 사용될 수 있다.

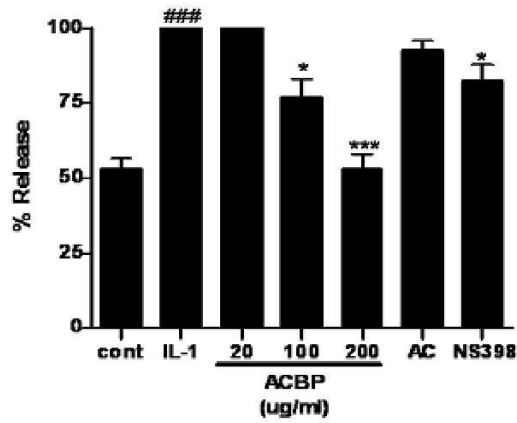
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 ACBP 처리시 인터루킨-1에 의한 연골세포 분해억제를 사람 관절 배지중 GAG (Glycosaminoglycan) 의 농도를 통해 확인한 것이고,
- <2> 도 2는 ACBP 처리시 인터루킨-1에 의한 연골세포 분해억제를 토끼 관절 배지중 GAG (Glycosaminoglycan)의 농도를 통해 확인한 것이며,
- <3> 도 3은 ACBP 처리시 토끼의 연골조직에서 인터루킨-1에 의한 MMP-1 활성억제를 알아본 것이고,
- <4> 도 4은 ACBP 처리시 토끼의 연골조직에서 인터루킨-1에 의한 MMP-3 활성억제를 알아본 것이며,
- <5> 도 5는 ACBP 처리시 사람의 연골조직에서 인터루킨-1에 의한 MMP-1 활성억제를 알아본 것이고,

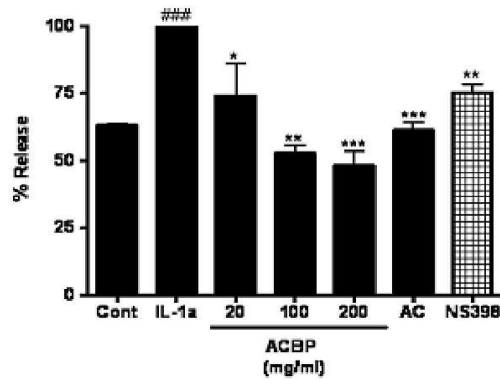
- <6> 도 6는 ACBP 처리시 사람의 연골조직에서 인터루킨-1에 의한 MMP-13 활성억제를 알아본 것이며,
- <7> 도 7는 ACBP 처리가 콘드로사이트의 생존에 미치는 영향을 나타낸 도이고,
- <8> 도 8는 CIA 동물모델에서 ACBP 처리가 COX의 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이며,
- <9> 도 9는 CIA 동물모델에서 ACBP 처리가 PGE2의 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이고,
- <10> 도 10는 CIA 동물모델인 토끼의 연골층의 조직화학적 염색을 나타낸 도이다.

도면

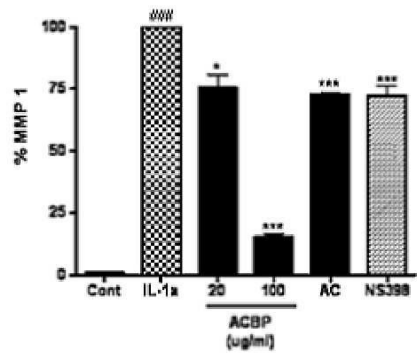
도면1



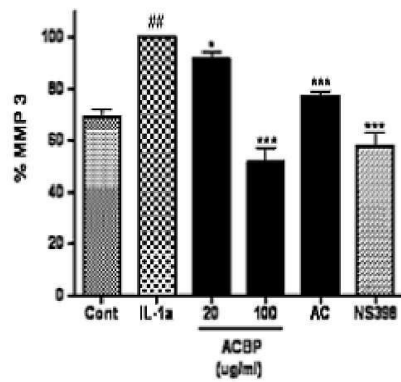
도면2



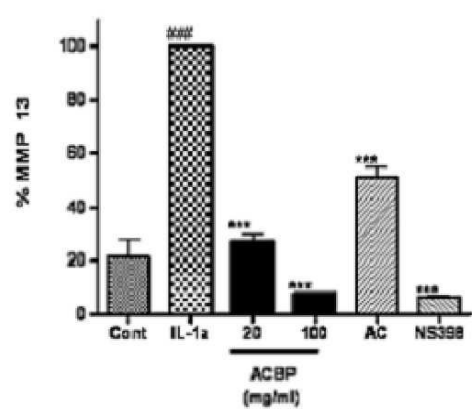
도면3



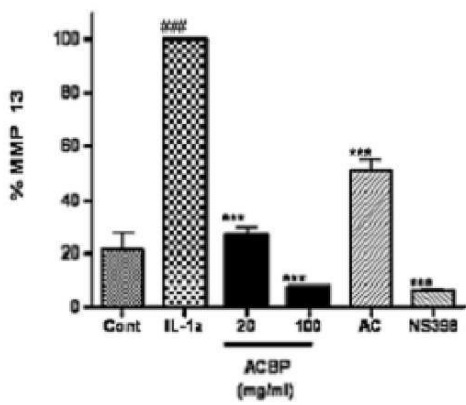
도면4



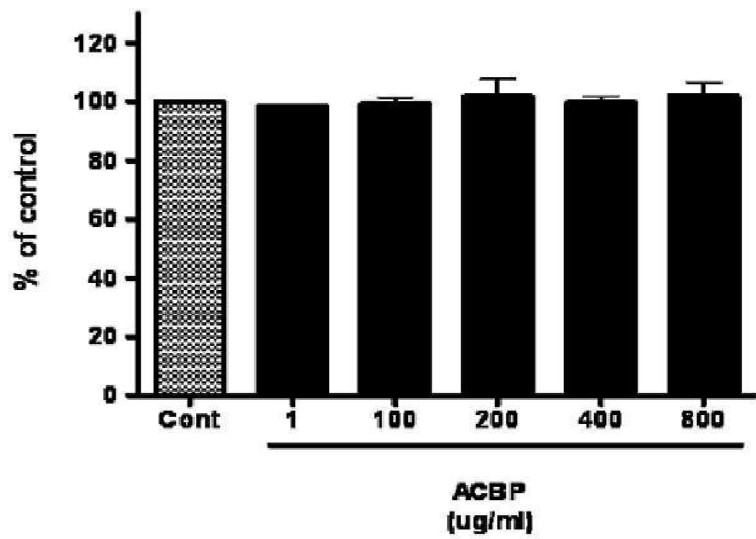
도면5



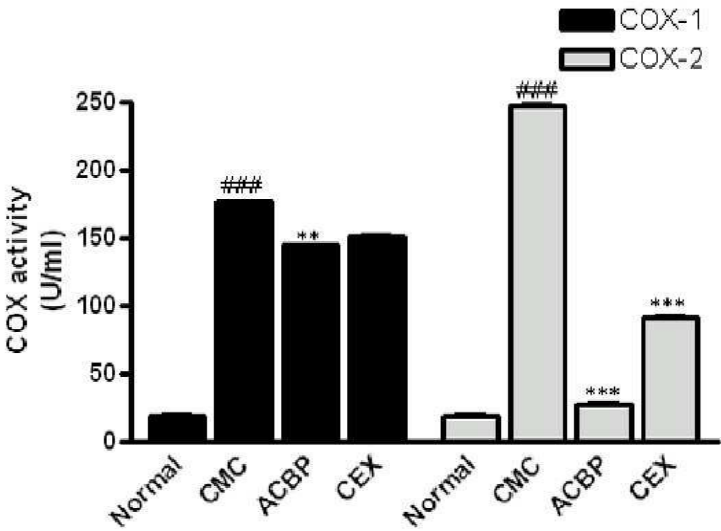
도면6



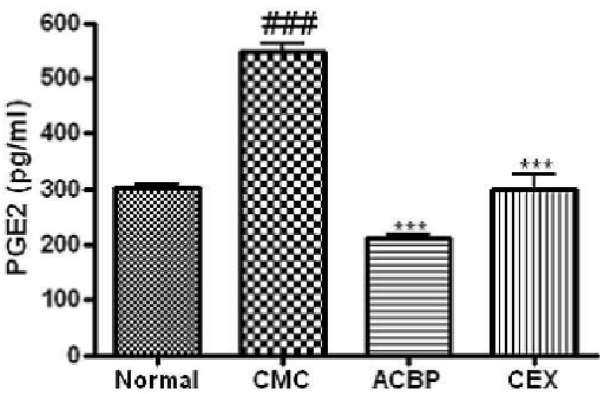
도면7



도면8



도면9



도면10

