(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0089660
(43) 공개일자 2009년08월24일

(51) Int. Cl.
A61K 36/355 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0014951
(22) 출원일자 2008년02월19일
심사청구일자 2008년02월19일

(71) 출원인
환인제약 주식회사
서울 송파구 문정동 84-1
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
박동석
서울 송파구 문정2동 훼미리아파트 210동 1503호
유명철
서울 동대문구 이문동 346-73호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

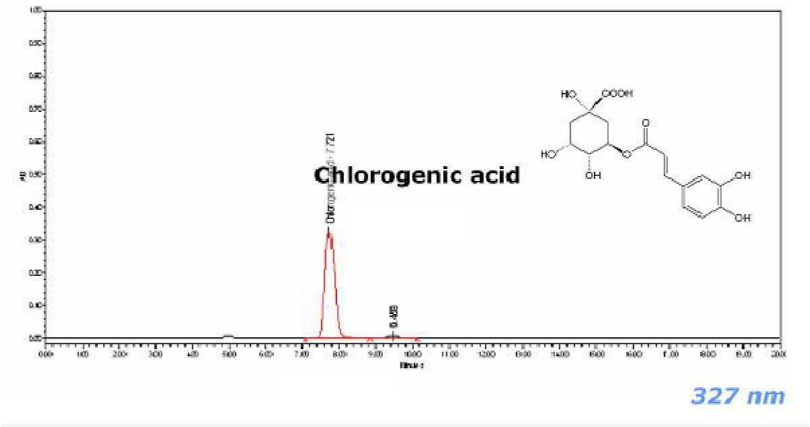
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 금은화 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 금은화(*Lonicera japonica* THUNB.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 금은화 추출물은 연골 구성물질의 분해 억제 및 세포 고사 억제 활성을 나타내며, 염증 및 통증 유발 동물에서 소염 및 진통 활성이 탁월하므로, 관절염의 예방 및 치료에 유용한 약학 조성물 및 건강기능식품에 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

최도영

경기 광주시 오포읍 신현리 현대모닝사이드1차아파트 204동 1502호

이재동

서울특별시 동대문구 이문동 426번지
삼성래미안APT 204-1601호

양형인

서울특별시 동대문구 이문동 삼성래미안 2차 104동 304호

백용현

서울 강남구 대치동 청실아파트 3동 1005호

허정은

서울 서대문구 연희동 712번지 14-6

김경수

서울특별시 양천구 목6동 902 219동 1502호

조용백

경기 안양시 동안구 평촌동 꿈마을아파트 101동 1105호

정인호

경기도 수원시 장안구 정자동 297-2 경남아너스빌 아파트105동 602호

허종현

경기도 수원시 영통구 매탄1동 176 현대홈타운 아파트 133동 604호

특허청구의 범위

청구항 1

금은화 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매에 가용한 추출물인 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 지표성분으로서 클로로제닌산(Chlorogenic acid)을 포함함을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 50% 중량으로 포함됨을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 5

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

청구항 6

금은화 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제 6항에 있어서, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> [문헌 1] Badger, A.M., Cook, M.N., et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290, pp 587-593, 1999

<3> [문헌 2] 신민교, 정보섭, 도해 향약대사전, pp. 939 ~ 940, 1989

<4> [문헌 3] 최호영 외, 본초학, p 198

<5> [문헌 4] Fazli-Tabaei S et al., *Behav. Pharmacol.*, 16, pp613-619, 2005

<6> [문헌 5] James D. Pomonis *et al.*, *Pain*, 114, pp339-346, 2005

<7> [문헌 6] Shaw FZ et al., *Brain Res.*, 911(2), pp105-115, 2001

<8> [문헌 7] Randall LO and Selitto JJ, Arch Int Pharmacodyn, 111, pp409-419, 1957

<9> [문헌 8] Gabor M, Mouse ear indlammation models and their pharmacological applications, 2000, pp24-28, Published by Akademiai Kiado, Budapest

<10> [문헌 9] Patrick et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 81, pp476-490, 1985

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<11> 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 골관절 질환중 하나인 퇴행성 관절염은 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 치료시 장기간에 걸친 전신투여는 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 인구의 노령화에 비례하여 증가하는 퇴행성 관절염에 항염증작용 등의 대증요법적 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, 자유라디컬 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, pp 587-593, 1999)

<12> 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 연구을 통해 그 기전을 규명함으로써, 신개념의 관절염 치료 한약물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

<13> 금은화 (*Lonicera japonica* THUNB.)는 인동덩굴의 꽃봉오리로, 꽃에는 루테올린, 이노시톨 약 1%가 함유되어 있으며, 이외에 사포닌, 탄닌, 이소클로로제닌산 (isochlorogenic acid), 클로로제닌산 (chlorogenic acid) 등을 함유한다 (신민교, 정보섭, 도해 향약대사전, pp. 939 ~ 940, 1989; 최호영 외, 본초학, p 198).

<14> 본 발명자들은 금은화 추출물이 진통억제 효과를 확인하였고, 연골조직에서의 프로테오글리칸 방출 억제 효과 및 연골조직 분해 효소인 MMP-1 및 MMP-3 활성 억제 등의 연골보호효과를 확인하여 관절염 치료 및 예방용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

<15> 상기 목적을 달성하기 위하여, 금은화 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

<16> 또한, 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

<17> 본원에서 정의되는 추출물은 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올, 보다 바람직하게는 30 내지 70% 에탄올에 가용한 추출물을 의미한다.

<18> 또한 본원에서 정의되는 추출물은 지표성분으로서 클로로제닌산을 바람직하게는 1.5 내지 4.0 (w/w%)의 클로로제닌산을 포함함을 특징으로 한다.

<19> 상기 관절염은 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염 또는 루푸스(Lupus) 관절염으로부터 선택된 하나 이상의 질환, 바람직하게는 퇴행성 관절염을 포함한다.

<20> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<21> 본 발명의 추출물은 하기와 같이 제조될 수 있다.

<22> 본 발명의 금은화를 음건하여 마쇄한 후, 건조된 시료의 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 5 내지 10배 분량의 물 또는 에탄올, 메탄올 등과 같은 C_1 내지 C_4의 저급 알코올 또는 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.5내지 1:5의 혼합비(kg/ℓ)를 갖는 알코올 수용액으로, 80℃에서 약 1 내지 6시간, 바람직하게는 2 내지 4시간 동안 교반추출, 열탕 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 열탕 추출한 후 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 건조하여 본 발명의 금은화 추출물을 얻을 수 있다.

<23> 본 발명은 상기 제조방법으로 얻어지는 금은화 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

<24> 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 50% 중량으로 포함한다.

<25> 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.

<26> 본 발명의 금은화 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

<27> 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 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, 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. 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 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 스티레이트 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, 동결건조제제, 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<28> 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.

<29> 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.

<30> 본 발명은 관절염의 예방 및 개선 효과를 나타내는 금은화 추출물을 유효성분으로 함유하는 관절염의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

<31> 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 관절염의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 금은화 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.

<32> 본 발명의 금은화 추출물 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

<33> 본 발명의 상기 추출물은 관절염의 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 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

<34> 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 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

<35> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(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 쥬스 및 과일 쥬스 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.

효 과

<36> 본 발명의 금은화 추출물은 연골 구성물질의 분해 억제 및 세포 고사 억제 활성을 나타내며, 염증 및 통증 유발 동물에서 소염 및 진통 활성이 탁월하므로, 관절염의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<37> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<38> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

<39> **실시예 1. 금은화 추출물 (GA50E)의 제조**

<40> 경희의료원에서 구입한 금은화 100 g을 음건 후 세절하여 0.7 ℓ의 50% 에탄올 수용액을 가해 잘 교반하여 주면서 4시간 동안 열탕 추출하였다. 여과 후, 농축하여 0.1 L로 농축하였으며, 여기에 동량의 수포화 부틸알콜을 가하여 층분리한 후 부틸알콜층 만을 모아 추출물이 완전 건조될 때까지 감압 농축하였다. 농축하여 건조 시킨 후, 금은화 추출물 7 g을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다 (이하 'GA50E'라 명명함).

<41> 도 1에 나타난 바와 같이, 상기의 방법으로 추출, 정제한 추출물을 이용하여 수행한 크로마토그램 분석결과, 클로로제닌산(Clorogenic acid) 함량은 2.2%였다 (도 1 참조).

<42> **실시예 2. 금은화 추출물 (GB50E)의 제조**

<43> 경희의료원에서 구입한 금은화 100 g을 음건 후 세절하여 0.7 ℓ의 50% 에탄올 수용액을 가해 잘 교반하여 주면서 4시간 동안 열탕 추출하였다. 여과 후, 농축하여 건조 시킨 후, 금은화 추출물 40 g을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

<44> 도 1에 나타난 바와 같이, 상기의 방법으로 추출, 정제한 추출물을 이용하여 수행한 크로마토그램 분석결과, 클로로제닌산(Clorogenic acid) 함량은 3.0%였다 (도 1 참조).

<45> **실험예 1. 포르말린 진통 실험 (Formalin analgesia test)**

<46> 상기 실시예 1과 2에 대한 진통효과를 알아보기 위해 포르말린 동물모델 실험을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다 (Fazli-Tabaei S et al., *Behav. Pharmacol.*, 16, pp613-619, 2005).

<47> 실험동물로는 체중 20~ 25 g의 수컷 ICR 마우스 (오리엔트바이오, 인본)를 수일간 순화시킨 후, 각 군당 8마리

씩 사용하였다. 각 처리군 별 약물을 경구투여하고, 1시간 후 10 % 포르말린용액 (formalin, 시그마사, 미국)을 좌측 후지에 피하 투여하고, 주사 직후부터 5분까지(1st phase)와 피하주사 직후 15분부터 20분까지(2nd phase)마우스가 발바닥을 핥는 시간을 측정하여 기록하였으며, 억제율(%)은 셀레콕시브 처리군의 평균시간을 100으로 기준하였을 시 상대수치로 나타내었다.

표 1

<48>

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*	
		1st phase	2nd phase
GA50E(실시예 1)	400	110	70.0
GB50E(실시예 2)	400	115	78.0
* 인도메타신의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율			

<49> 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 금은화 추출물인 실시예 1과 실시예 2 모두 진통 억제율이 뛰어남을 확인할 수 있었다.

<50> **실험예 2. MIA (Monosodium Iodoacetate) model**

<51> 상기 실시예 1과 2에 대한 진통효과를 알아보기 위해 MIA(monosodium iodoacetate)로 유도한 관절염 동물모델 실험을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다 (James D. Pomonis *et al.*, *Pain*, 114, pp339-346, 2005).

<52> 실험동물로는 체중 200~ 220 g의 수컷 SD 랫트 (오리엔트바이오, 일본)를 수일간 순화시킨 후, MIA(monosodium iodoacetate)(SIGMA, St. Louis, MO; cat # I2512)를 식염수에 녹여 왼쪽 뒷발 무릎 관절강 내에 주사함으로써 관절염을 유발시키고 1주 동안의 회복기간을 두었다. 1주 후 incapacitance tester (Linton, Stoelting Co., Wood Dale, IL)을 이용해 관절염이 유발된 개체를 선별하고 선별된 개체들만으로 군을 구성하여 각 군당 8마리씩이 되도록 한다. 군 분리 후 유발 8일째부터 매일 같은 시간대에 약물을 경구투여하고, 약물 투여를 시작한 지 1주일 후부터 측정을 시작하며 3주 동안 주 1회 실시한다. 측정은 incapacitance tester(Linton, Stoelting Co., Wood Dale, IL)을 이용하였고, 측정치는 하기 수학식 1을 이용하였으며, 억제율(%)은 셀레콕시브 처리군의 평균 측정값을 100으로 기준하였을 시 상대수치로 나타내었다.

수학식 1

<53> % 왼쪽 뒷다리의 무게 = ({왼쪽 뒷다리의 무게/(왼쪽 뒷다리의 무게 + 오른쪽 뒷다리의 무게)} x 100)

표 2

<54>

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)* (3주째)
GA50E(실시예 1)	400	72.0
GB50E(실시예 2)	400	85.1
* 셀레콕시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

<55> 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 금은화 추출물인 실시예 1과 실시예 2 모두 진통 억제율이 뛰어남을 확인할 수 있었다.

<56> **실험예 3. 복사 유도 꼬리 뒤틀림 진통 실험 (Radiation - induced Tail flick analgesia test)**

<57> 상기 실시예 1과 2의 통증억제효과를 알아보기 위해 꼬리 뒤틀림 실험(tail flick test)을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다(Shaw FZ et al., *Brain Res.*, 911(2), pp105-115, 2001).

<58> 실험동물로는 체중 20 ~ 25 g의 수컷 ICR 마우스 (오리엔트바이오, 일본)를 수일간 순화시킨 후, 각 군당 8마리씩 사용하였다. 실험 약물을 각각 경구투여하고, 1시간 후에 적외선을 꼬리의 정중부에 조사한 후, 회피반응을 보이기까지의 시간을 측정하였으며, 양성대조군인 셀렉콕시브(화이자 제약)의 억제효과를 기준으로 하여 상대 억제율(%)을 계산하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

<59>

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*
GA50E(실시예 1)	400	95.9
GB50E(실시예 2)	400	105.4
* 셀레콕시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

<60> 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 금은화 추출물인 실시예 1과 실시예 2 모두 진통 억제율이 뛰어남을 확인할 수 있었다.

<61> **실험예 4. 족압 진통 실험 (Paw pressure analgesia test)**

<62> 상기 실시예 1과 2에 대한 진통효과를 알아보기 위해 족압 진통 실험 (paw pressure analgesia test)을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다 (Randall LO and Selitto JJ, Arch Int Pharmacodyn, 111, pp409-419, 1957).

<63> 실험동물로는 체중 180 ~ 200g의 수컷 SD 랫트 (오리엔트바이오, 일본) 8 마리를 수일간 순화시킨 후 사용하였다. 각 처리군 별 약물을 경구투여하고, 1 시간 후 2 % 카라기난 (carrageenan, 시그마사, 미국)을 좌측 후지에 피하 투여하고, 피하 주사 3시간 후, 진통계측기 (analgesic meter, Ugobasile, Italy)를 사용하여 통증에 의한 회피 반응을 보일 때까지의 무게를 측정하였으며, 셀레콕시브의 투여군의 무게를 기준으로 억제율(%)을 계산하여 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

<64>

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*
GA50E(실시예 1)	400	82.5
GB50B(실시예 2)	400	96.8
셀레콕시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

<65> 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 금은화 추출물인 실시예 1과 실시예 2 모두 진통 억제율이 뛰어남을 확인할 수 있었다.

<66> **실험예 5. 크로톤오일 유발 귀부종 소염 실험 (Croton oil - induced ear oedema)**

<67> 크로톤 오일 (Croton oil)은 피부에 도포하면 도포 면에 발적, 종창 및 수포가 생기는 염증작용을 일으킨다. 실시예 1과 2에 대한 소염 활성을 평가하기 위해 크로톤 오일로 부종을 유발한 마우스를 이용하여 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실험을 실시하였다 (Gabor M, Mouse ear indlammation models and their pharmacological applications, 2000, pp24-28, Published by Akademiai Kiado, Budapest).

<68> 실험동물로는 체중 20~25g의 수컷 마우스 (오리엔트바이오, 일본)을 각 군당 6마리씩 사용하였다. 실험구별 처리약물을 경구투여하고, 1시간 후 아세톤으로 녹인 2.5 %의 크로톤 오일을 마우스의 오른쪽 귀의 안쪽과 바깥쪽에 골고루 도포하여 귀의 부종을 유발하였다. 부종유발 4시간 후, 마우스를 에테르로 과마치사 시킨 후, 두께 측정기(thickness gauge)를 이용하여 속도변화법(Patrick et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 81, pp476-490, 1985)으로 마우스의 귀의 부종정도를 측정하였고, 셀레콕시브의 투여군의 무게를 기준으로 억제율(%)을 계산하여 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

<69>

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*
GA50E(실시예 1)	400	100.9
GB50B(실시예 2)	400	110.2
셀레콕시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

<70> 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 금은화 추출물인 실시예 1과 실시예 2 모두 소염 작용이 뛰어남을 확인할

수 있었다.

<71> 하기에 본 발명의 추출물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<72> **제제예 1. 산제의 제조**

<73> 실시예 1 (GA50E) 20 mg

<74> 유당 100 mg

<75> 탈크 10 mg

<76> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

<77> **제제예 2. 정제의 제조**

<78> 실시예 2 (GB50E) 10 mg

<79> 옥수수전분 100 mg

<80> 유당 100 mg

<81> 스테아린산 마그네슘 2 mg

<82> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<83> **제제예 3. 캅셀제의 제조**

<84> 실시예 1 (GA50E) 10 mg

<85> 결정성 셀룰로오스 3 mg

<86> 락토오스 14.8 mg

<87> 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

<88> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<89> **제제예 4. 주사제의 제조**

<90> 실시예 2 (GB50B) 10 mg

<91> 만니톨 180 mg

<92> 주사용 멸균 증류수 2974 mg

<93> $Na_2HPO_4.12H_2O$ 26 mg

<94> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2㎖) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<95> **제제예 5. 액제의 제조**

<96> 실시예 1 (GA50E) 20 mg

<97> 이성화당 10 g

<98> 만니톨 5 g

<99> 정제수 적량

<100> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100㎖로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<101> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<102> 실시예 2 (GB50E) 1000 mg

<103> 비타민 혼합물 적량

<104> 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

<105> 비타민 E 1.0 ㎎

<106> 비타민 B1 0.13 ㎎

<107> 비타민 B2 0.15 ㎎

<108> 비타민 B6 0.5 ㎎

<109> 비타민 B12 0.2 ㎍

<110> 비타민 C 10 ㎎

<111> 비오틴 10 ㎍

<112> 니코틴산아미드 1.7 ㎎

<113> 엽산 50 ㎍

<114> 판토텐산 칼슘 0.5 ㎎

<115> 무기질 혼합물 적량

<116> 황산제1철 1.75 ㎎

<117> 산화아연 0.82 ㎎

<118> 탄산마그네슘 25.3 ㎎

<119> 제1인산칼륨 15 ㎎

<120> 제2인산칼슘 55 ㎎

<121> 구연산칼륨 90 ㎎

<122> 탄산칼슘 100 ㎎

<123> 염화마그네슘 24.8 ㎎

<124> 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.

<125> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<126> 실시예 1 (GA50E) 1000 ㎎

<127> 구연산 1000 ㎎

<128> 올리고당 100 g

<129> 매실농축액 2 g

<130> 타우린 1 g

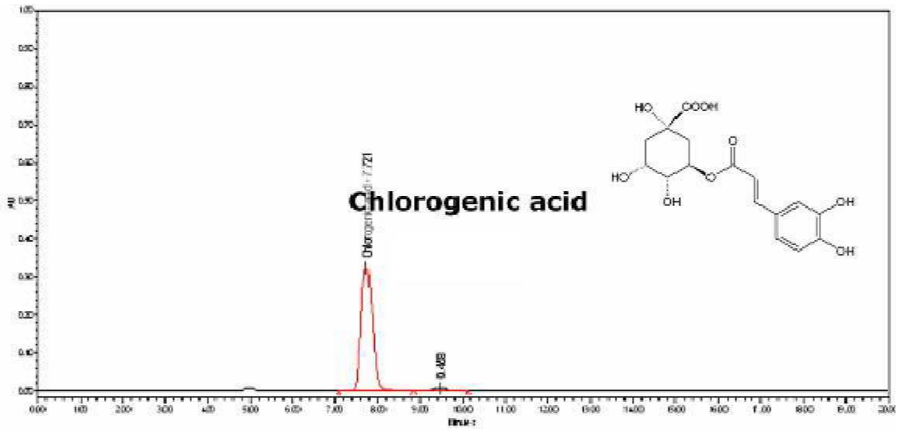
<131> 정제수를 가하여 전체 900 ㎖

<132> 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.

<133> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면의 간단한 설명

<134> 도 1은 금은화 추출물의 지표성분인 클로로제닌산을 크로마토그램을 수행하여 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도면

도면1