



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월21일
(11) 등록번호 10-0830553
(24) 등록일자 2008년05월13일

(51) Int. Cl.

A61K 36/237 (2006.01) A61K 36/71 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0124410

(22) 출원일자 2006년12월08일

심사청구일자 2006년12월08일

(56) 선행기술조사문헌

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

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

Mediators of Inflammation, 8, 173-175 (1999)

(73) 특허권자

SK케미칼 주식회사

경기 수원시 장안구 정자1동 600번지

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 2 항

심사관 : 이민정

(54) 독활 및 승마 혼합생약추출물을 포함하는 염증관련 질환예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 독활(*Aralia cordata* THUNB.) 및 승마(*Cimicifuga heracleifolia* Kom.)의 혼합생약추출물을 함유하는 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 조성물은 연골 조직 보호 효과, 소염 및 진통 효과를 나타내므로 염증관련 질환, 특히 관절염 예방 및 치료용 조성물로 이용될 수 있다.

(72) 발명자

최도영

경기 광주시 오폭읍 신현리 현대모닝사이드1차아파트 204동 1502호

이재동

서울특별시 동대문구 이문동 426번지 삼성래미안APT 204-1601호

양형인

서울 동대문구 이문동 삼성래미안 2차 104동 304호

백용현

서울 강남구 대치동 청실아파트 3동 1005호

허정은

서울 서대문구 연희동 712번지 14-6

김경수

서울 양천구 목6동 902 219동 1502호

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

유현승

경기 성남시 분당구 야탑동 장미마을동부아파트 119동 1502호

전효진

서울 영등포구 신길7동 삼환아파트 103동 701호

김지홍

경기 수원시 장안구 율전동 433-106번지 302호

손현주

서울 강남구 대치동 963-1 영동타운 A동 201호

최상근

서울 관악구 봉천9동 벽산아파트 603동 1402호

특허청구의 범위

청구항 1

독활(*Aralia cordata* THUNB.) 및 승마(*Cimicifuga heracleifolia* Kom.)의 혼합건조 중량비가 0.1~10 : 1 인 혼합생약 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성관절염, 류마티스성 관절염, 급성 통증, 만성 통증, 관절통, 신경병적 통증, 수술 후 통증, 편두통, 과민성 장증후군 또는 염증성 장 질환의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

독활(*Aralia cordata* THUNB.) 및 승마(*Cimicifuga heracleifolia* Kom.)의 혼합건조 중량비가 0.1~10 : 1 인 혼합생약 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성관절염, 류마티스성 관절염, 급성 통증, 만성 통증, 관절통, 신경병적 통증, 수술 후 통증, 편두통, 과민성 장증후군 또는 염증성 장 질환의 개선용 건강기능 식품.

청구항 6

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<1> 본 발명은 독활 및 승마 혼합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증관련 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

<2> 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 요인으로서는 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 좀 더 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, 연골분해방

지 및 재생촉진에 관심을 두고 관절조직분해효소 저해제, 자유라디칼 소거제(SOD등 활성산소류 제거효소), 관절 조직구성성분(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.

<3> 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.

<4> 이들 각각의 생약들의 특성과 구체적인 작용을 살펴보면 다음과 같다.

<5> 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 전초를 해열제, 이뇨제 및 진통제로 사용한다. 약으로는 뿌리를 사용하는데 거풍제습, 통비지통의 효능이 있어 비증, 신경통, 두통, 중풍후유증 등의 처방에 사용한다. 뿌리에는 정유 (essential oil)가 함유되어 있고, 정유 중에는 리모넨 (limonen), 사비넨 (sabinene), 알파-피넨 (α -pinene), 감마-테르피넨 (γ -terpinene), 미르센 (myrcene), 휴물렌 (humulene, α -caryophyllene), 알파-코페인 (α -copaene), 테르피넨-4-올 (terpinene-4-ol)이 함유되어 있다 (정보섭 및 신민교저, *도해향약(생약)대사전*, 영림사, p435, 1990).

<6> 승마(*Cimicifuga heracleifolia* Kom.)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초본으로 뿌리줄기를 약용으로 사용한다. 한방에서는 승양, 해포, 투진, 해독의 효능을 가진 것으로 알려져 있다. 승마의 근경에는 시미시푸긴(cimicifugine), 살리실산(salicylic acid), 탄닌(tannin), 레진(resin), 카페인산(caffeic acid), 페룰린산(ferulic acid), 시미틴(cimitin), 알칼로이드(alkaloid), 당류, 유기산, 글리코시드(glycosides), 이소페루라산(isoferulic acid)이 함유되어있다.(강소신의학원 편, *중약대사전*, 도서출판 정담, pp3362~3372, 1998)

<7> 이상과 같이 이들 각각의 생약들은 각종 상처나 급 만성염증과 빈혈, 두통, 감기 및 해독 등에 일반적으로 사용되는 약재이며, 또한 각각의 생약재들은 고유한 약리작용 및 주 효능을 지니고 있다.

<8> 그러나 지금까지는 이들 각각의 생약들은 단방 생약으로서의 효능과 유효성분 분리 및 제조방법에 대해서만 연구되어 왔으며, 또한 간혹 몇 가지 약재들을 혼합하여 사용해 관절염에 대한 치료효과를 보려는 시도가 있었지만 이들의 관절염 치료에 대한 약효가 과학적으로 입증될만한 것이 못되었고 그 효과도 미비하였다. 더구나 관절염 치료의 근본인 연골보호효과에 효능이 있는 것에 초점이 맞추어져 있지 않았다.

<9> 이에 본 발명자는 상기 혼합생약으로부터 이들 각각의 생약들의 특성과 효능을 최대한 살리고 염증관련 질환에 대한 효과, 특히 관절염에 대한 치료효과 및 관절보호효과를 극대화시키기 위하여 한방의 원리에 근거한 거풍습, 강근골, 활혈 및 조직재생 촉진작용을 중심으로 100여종의 후보 생약을 선정하여 이를 바탕으로 염증관련 질환 치료에 대한 검정 실험을 거쳐 괄목한 만한 염증관련 질환, 특히 관절염 치료효과를 갖는 생약의 배합을 찾아내어 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<10> 본 발명은 탁월한 연골조직 보호효과, 소염 및 진통 효과를 갖는 독활 및 승마의 혼합생약추출물을 유효성분으로 함유하는 염증관련 질환, 특히 관절염의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품을 제

공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <11> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 독활 및 승마 혼합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 관련 질환의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품을 제공한다.
- <12> 상기 혼합생약추출물은 독활 및 승마의 혼합 건조 중량비가 0.1~ 10: 1, 바람직하게는 0.5~ 5: 1, 보다 바람직하게는 1~ 2: 1, 가장 바람직하게는 1: 1로 혼합된 것임을 특징으로 한다.
- <13> 상기 염증 관련 질환에는 퇴행성관절염, 류마티스성 관절염, 급성 통증, 만성 통증, 관절통, 천식, 신경병적 통증, 수술 후 통증, 편두통, 신경병증, 신경손상, 과민성 장증후군, 내독소에 의한 쇼크 또는 염증성 장 질환 등, 바람직하게는 퇴행성관절염 또는 류마티스성 관절염을 포함한다.
- <14> 상기 추출물은 물 및 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올의 혼합용매, 보다 바람직하게는 20~ 80 % 물 및 에탄올의 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.
- <15>
- <16> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <17> 본 발명의 혼합생약추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.
- <18> 본 발명의 독활 및 승마를 세절하여 적절한 배합비, 바람직하게는 0.1~10 : 1, 더욱 바람직하게는 0.5~5: 1 의 건조중량 배합비(w/w)로 혼합하여 준비한 시료 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 5 내지 15 배 분량의 물 및 에탄올, 메탄올 등과 같은 탄소수 1 내지 탄소수 4의 저급 알콜 또는 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.2 내지 1:5의 혼합비(v/v)를 갖는 물 및 에탄올의 혼합용매로, 실온에서 약 0.5 내지 48시간, 바람직하게는 1 내지 15시간 동안 교반 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 상온 추출, 가온 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 교반 추출, 환류 추출 및 가온 추출한 후 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 건조하여 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약 추출물을 수득할 수 있다.
- <19> 또한 본 발명은 상기의 제조공정으로 얻어진 독활 및 승마 혼합생약추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 관련 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- <20> 본 발명의 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- <21> 본 발명의 염증관련 질환의 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 혼합생약추출물을 0.1 ~ 50 중량% 포함한다.
- <22> 본 발명의 혼합생약추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- <23> 본 발명의 혼합생약추출물을 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. 본 발명의 혼합생약추출물을 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 등

이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<24> 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 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.

<25> 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.

<26> 또한, 본 발명은 독활 및 승마 혼합생약추출물을 유효성분으로 함유하는 염증관련 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

<27> 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.

<28> 상기 혼합생약추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등이 있다.

<29> 또한, 염증관련 질환의 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.

<30> 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.

<31> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 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 중요한 것이 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<32> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<33> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<34> 비교예 1. 독활 추출물 제조

<35> 경희의료원 한방병원에서 구입하여 약 1.0 cm 정도의 크기로 세절한 독활 200 g에 1.5 L의 70 %(v/v) 에탄올을 가해 고루 섞은 후, 4시간 환류추출 하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 1.5 l의 70 %(v/v) 에탄올을 가하여 4시간 재가온 추출 후, 여액을 모두 합하여 1 l로 농축, 동결건조하여 분말상태의 독활 추출물 50 g을 수득하였다.

<36> 비교예 2. 승마 추출물 제조

<37> 경희의료원 한방병원에서 구입한 승마 200 g을 고루 섞은 후, 1.5 L의 70%(v/v) 에탄올을 가해 잘 교반

하여 주면서 4시간 환류 추출하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 1.5 L의 70%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 4 시간 재 가온 추출한 후, 여액을 모두 합하여 1 L로 농축 후, 동결 건조하여 분말상태의 승마 추출물 38 g을 수득하였다.

<38> 실시예 1. 독활 및 승마 혼합생약 추출물 제조

<39> 경희의료원 한방병원에서 구입한 독활 100g 및 승마 100 g을 고루 섞은 후, 1.5 L의 70%(v/v) 에탄올을 가해 잘 교반하여 주면서 4 시간 환류 추출하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 1.5 L의 70%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 4 시간 재 가온 추출한 후, 여액을 모두 합하여 1 L로 농축 후, 동결 건조하여 분말상태의 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약추출물 44 g을 수득하였다.

<40> 실험예 1. 진통효과 측정

<41> 1-1. 복사 유도 꼬리 뒤틀림 진통 실험 (Radiation - induced Tail flick analgesia test)

<42> 본 발명의 혼합생약추출물의 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).

<43> 실험동물로는 체중 20 ~ 25 g의 수컷 ICR 마우스 (오리엔트바이오, Japan)를 수일간 순화시킨 후, 각 군당 8마리씩 사용하였다. 실험 약물을 각각 경구투여하고, 1시간 후에 적외선을 꼬리의 정중부에 조사한 후, 회피반응을 보이기까지의 시간을 측정하였으며, 양성대조군인 셀렉코시브의 억제효과를 기준으로 하여 상대 억제율(%)을 계산하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*
비교예 1 (독활)	400	102.2
비교예 2 (승마)	400	92.4
실시예 1 (독활+승마)	400	109.9
* 셀렉코시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

<44> 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약 추출물은 단일생약처리군보다 탁월한 통증억제효과를 나타내었다.

<46> 1-2. 초산유도 진통시험 (Acetic acid - induced writhing)

<47> 본 발명의 혼합생약추출물에 대한 진통 효과를 알아보기 위해 초산유도 진통시험을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다(B.A. Whittle, *Brit. J. Pharmacol.*, 22, pp246-253, 1964).

<48> 실험동물로 수컷 ICR 마우스(체중 20-25g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 실시예 1에서 수득한 혼합생약추출물을 경구투여 후, 1시간 후에 0.7% 아세트산 (v/v in DW)을 복강 투여하여 통증을 유발하였고, 투여 5분 후부터 10분간 동물을 관찰하여 뒤틀림(writhing) 횟수를 기록 후, 양성대조군인 셀렉코시브의 처리군의 뒤틀림 횟수를 100으로 기준하여 억제율(%)을 계산하였다.

표 2

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*
비교예 1 (독활)	400	130.6
비교예 2 (승마)	400	125.6
실시예 1 (독활+승마)	400	180.6
* 셀렉코시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

<49> 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약 추출물은 단일생약처리군보다 탁월한

통증억제효과를 나타내었다.

1-3. 족열 진통 실험 (Hot plate test)

본 발명의 혼합생약추출물에 대한 진통효과를 알아보기 위해 족열 진통 실험 (hot plate test)을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다 (Lanhers *et al.*, *Planta Medica*, 58, pp117-123, 1992).

동물은 수컷 ICR 마우스(20~25g)를 각 군당 8마리씩 사용하였다. 실험 방법은 시험물질을 경구 투여하고 1시간 후에 마우스를 55℃의 핫 플레이트 위에 올려놓고 마우스가 발바닥을 핥거나 뛰어오르기까지의 시간을 측정하여 기록하였으며, 억제율(%)은 셀레콕시브 처리군의 평균반응시간을 100으로 기준하였을 시, 상대수치로 나타내었다.

표 3

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*
비교예 1 (독활)	400	86.9
비교예 2 (승마)	400	86.7
실시예 1 (독활+승마)	400	92.1
* 셀레콕시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

상기 표 3에서 보는 바와 같이, 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약 추출물은 단일생약처리군보다 탁월한 통증억제효과를 나타내었다.

1-4. 포르말린 진통 실험 (Formalin analgesia test)

본 발명의 혼합생약추출물에 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).

실험동물로는 체중 20~ 25 g의 수컷 ICR 마우스 (오리엔트바이오, Japan)를 수일간 순화시킨 후, 각 군당 8마리씩 사용하였다. 각 처리군 별 약물을 경구투여하고, 1시간 후 10 % 포르말린용액 (formalin, Sigma, USA)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 4

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*	
		1st phase	2nd phase
비교예 1 (독활)	400	80.3	76.6
비교예 2 (승마)	400	66.5	60.9
실시예 1 (독활+승마)	400	151.2	276.8
* 셀레콕시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율			

상기 표 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약 추출물은 단일생약처리군보다 탁월한 통증억제효과를 나타내었다.

1-5. 족압 진통 실험 (Paw pressure analgesia test)

본 발명의 혼합생약추출물에 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).

실험동물로는 체중 180 ~ 200g의 수컷 SD 랫트 (오리엔트바이오, Japan) 8 마리를 수일간 순화시킨 후

사용하였다. 각 처리군 별 약물을 경구투여하고, 1 시간 후 2 % 카라기난 (carrageenan, Sigma, USA)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 5에 나타내었다.

표 5

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*
비교예 1 (독활)	400	91.8
비교예 2 (승마)	400	85.4
실시예 1 (독활+승마)	400	115.0
셀레콕시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

<64>

<65> 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약 추출물은 단일생약처리군보다 탁월한 통증억제효과를 나타내었다.

<66> 실험예 2. 소염효과 측정

<67> 2-1. 크로톤오일 유발 귀부종 소염 실험 (Croton oil - induced ear oedema)

<68> 크로톤 오일 (Croton oil)은 피부에 도포하면 도포 면에 발적, 종창 및 수포가 생기는 염증작용을 일으킨다. 본 발명의 혼합생약추출물에 대한 소염 활성을 평가하기 위해 크로톤 오일로 부종을 유발한 마우스를 이용하여 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실험을 실시하였다 (Gabor M, *Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications*, Published by Akademiai Kiado, Budapest, pp24-28, 2000).

<69> 실험동물로는 체중 20~25g의 수컷 마우스 (오리엔트바이오, Japan)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 6에 나타내었다.

표 6

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*
비교예 1 (독활)	400	106.0
비교예 2 (승마)	400	86.7
실시예 1 (독활+승마)	400	121.5
셀레콕시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

<70>

<71> 상기 표 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약 추출물은 단일생약처리군보다 탁월한 소염효과를 나타내었다.

<72> 2-2. 아라키돈산유발 귀부종 소염 실험 (Arachidonic acid - induced ear oedema)

<73> 아라키돈산은 혈소판의 응고, 동맥경화, 심장병 및 염증 등을 일으키는 프로스타글란딘의 전구체로 염증을 발생시키는 주요한 원인이 되는 물질이다. 본 발명의 혼합생약추출물에 대한 소염 활성을 평가하기 위해 아라키돈산 (arachidonic acid)으로 부종을 유발한 마우스를 이용하여 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와

같이 실험을 실시하였다 (Gabor M, *Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications*, Published by Akademiai Kiado, Budapest, pp42-55, 2000).

<74> 실험동물로는 체중 20~ 25 g의 수컷 ICR 마우스 (오리엔트바이오, Japan)을 각 군당 6마리씩 사용하였다. 실험구별 처리약물을 경구투여하고, 1시간 후에 아세톤으로 녹인 50 mg/ml의 아라키돈산을 마우스의 오른쪽 귀의 안쪽과 바깥쪽에 골고루 도포하여 귀의 부종을 유발하였다. 부종유발 1시간 후, 마우스를 에테르로 과마치사 시킨 후, 두께 측정기(thickness gauge)를 이용하여 속도변화법으로 마우스의 귀의 부종정도를 측정하였고, 셀레콕시브의 투여군의 무게를 기준으로 억제율(%)을 계산하여 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

구분	농도 (mg/kg)	억제율(%)*
비교예 1 (독활)	400	123.5
비교예 2 (승마)	400	106.8
실시예 1 (독활+승마)	400	140.8
셀레콕시브의 효능(억제율)을 100%로 보았을 때 상대 억제율		

<75>
<76> 상기 표 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약 추출물은 단일생약처리군보다 탁월한 소염효과를 나타내었다.

<77> 실험예 3. 연골보호효과 측정

<78> 연골 구성 요소인 프로테오글리칸이나 콜라겐을 빨리 생산해내지 못하여 연골의 쿠션기능이 없어지면, 연골이 상하고 관절염이 유발된다. 관절 연골은 윤활과 성장을 위한 물 (70~ 80 %), 콜라겐 (10~ 15 %), 프로테오글리칸 (5~ 10 %) 및 연골세포 (chondrocyte)로 구성되어있으며, 프로테오글리칸은 한 줄의 중심단백 (core protein)에 여러 개의 글리코스아미노글리칸 (GAG; glycosaminoglycan)이 붙어있는 구조를 가지고 있다.

<79> 본 발명의 혼합생약추출물의 관절보호효과를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 실시하였다.

<80> 3-1. 연골조직 배양

<81> 관절연골은 5주령 토끼 (Newzeland White Rabbit, 샘타코 코리아, 대한민국)의 관절에서 채취하였으며, 멸균상태에서 수술을 통하여 관절 표면을 드러낸 후, 대략 200-220 mg의 관절 표면을 취하여 배지(열처리로 비활성화된 5% fetal bovine serum(FBS)와 페니실린-스트렙토마이신 100 unit/ml이 함유된 DMEM)에 담가 놓았다. 조직을 배지로 수차례 씻어 낸 다음 37℃의 습한 95% CO2 배양기에서 1-2일간 배양하였다. 기존 배지를 기본 배지(열처리로 비활성화된 5% fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES 및 페니실린-스트렙토마이신 100 unit/ml 이 함유된 DMEM)로 교체 하였고, 30mg의 관절 조직을 48-웰 플레이트에 옮겨 놓은 후, 실험군별 시료를 처리하였다. 1시간동안 배양후, 인터루킨-1 α 5ng/mL을 배지에 넣어 염증을 유발시키고, 37℃에서 3일간 더 배양하였다. 상등액을 수거하였고, 시약이 들어있는 신선한 배지로 옮겨졌으며, 25일간 더 배양하였다. 3, 7, 14, 28일이 되는 때 상등액을 수집하였으며, 이를 -20℃에 보관하였다.

<82> 3-2. 글리코스아미노글리칸 (GAG) 분해 정도 측정

<83> 본 발명의 혼합생약추출물의 사람 및 토끼의 관절 연골조직에 대한 보호효과를 측정하기 위해 1,9-디메틸메틸렌블루 (1,9-dimethylmethylen blue; DMB) 어세이법을 사용하여 프로테오글리칸을 구성하는 GAG의 분해 정도를 알아보기 위해 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같은 실험을 실시하였다 (French MM et al., *Ann. Biomed. Eng.*, 32(1), pp50-56, 2004).

<84> 상기 실험예 3-1의 방법으로 수득한 연골조직의 배양 배지 중 GAG의 농도는 염료 용액(Blyscan dye solution)과 반응하여 생성된 음이온성 (polyanionic) 물질의 양에 의해 측정하였으며, 표준물질로는 황산콘드로이친 (chondroitin sulfate)을 사용하였다. 각 실험군 별 실험시약을 50 μ l씩 염료 용액 (Blyscan dye solution) 500 μ l과 섞고, 실온에서 30분 반응 시킨 후 12,000 rpm에서 10분 원심분리 시켰다. 침전물을 염료 해리 용액 (Blyscan dye-dissociation solution)에 녹인 후, 540 nm에서 분광학적 GAG량을 측정하였고, 인터루킨-1 α (IL-1 α)로 유도된 GAG 분해량을 기준으로 억제율(%)을 계산하여 나타내었다.

표 8

구분	농도 (mg/kg)	GAG 억제율(%) [*]
비교예 1 (독활)	400	37.49
비교예 2 (승마)	400	42.11
실시예 1 (독활+승마)	400	45.12

상기 표 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약 추출물은 단일생약처리군보다 배지 중으로의 GAG 분해를 탁월히 억제하였다.

실험예 4. 경구투여 독성실험

4주령의 ICR 마우스 (오리엔트바이오, Japan)를 사용하여 급성독성실험을 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실시하였다 (Haschek WM and Rousseaux CG, *Handbook of toxicologic pathology*, Published by Academic press, Inc., New York, pp294-295, 1991).

각 군 (5마리/군)에 본 발명의 혼합생약추출물을 용해시켜 5g/kg/10ml의 용량으로 단회 경구 투여하였다. 본 발명의 혼합생약추출물을 투여한 후, 동물의 폐사 여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

상기 실험결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 발명의 혼합생약추출물은 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 혼합생약추출물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

제제예 1. 산제의 제조

실시예 1의 혼합생약추출물	20 mg
유당	100 mg
탈크	10 mg

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

제제예 2. 정제의 제조

실시예 1의 혼합생약추출물	10 mg
옥수수전분	100 mg
유당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

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

제제예 3. 캡슐제의 제조

실시예 1의 혼합생약추출물	10 mg
결정성 셀룰로오스	3 mg
락토오스	14.8 mg
마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

<109> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<110> **제제예 4. 주사제의 제조**

<111> 실시예 1의 혼합생약추출물 10 mg

<112> 만니톨 180 mg

<113> 주사용 멸균 증류수 2974 mg

<114> Na₂HPO₄·12H₂O 26 mg

<115> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<116> **제제예 5. 액제의 제조**

<117> 실시예 1의 혼합생약추출물 20 mg

<118> 이성화당 10 g

<119> 만니톨 5 g

<120> 정제수 적량

<121> 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.

<122> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<123> 실시예 1의 혼합생약추출물 1000 mg

<124> 비타민 혼합물 적량

<125> 비타민 A 아세테이트 70 µg

<126> 비타민 E 1.0 mg

<127> 비타민 B1 0.13 mg

<128> 비타민 B2 0.15 mg

<129> 비타민 B6 0.5 mg

<130> 비타민 B12 0.2 µg

<131> 비타민 C 10 mg

<132> 비오틴 10 µg

<133> 니코틴산아미드 1.7 mg

<134> 엽산 50 µg

<135> 판토텐산 칼슘 0.5 mg

<136> 무기질 혼합물 적량

<137> 황산제1철 1.75 mg

<138> 산화아연 0.82 mg

<139> 탄산마그네슘 25.3 mg

<140> 제1인산칼륨 15 mg

<141> 제2인산칼슘 55 mg

<142> 구연산칼륨 90 mg

<143> 탄산칼슘 100 mg

<144> 염화마그네슘 24.8 mg

<145> 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.

<146> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<147> 실시예 1의 혼합생약추출물 1000 mg

<148> 구연산 1000 mg

<149> 올리고당 100 g

<150> 매실농축액 2 g

<151> 타우린 1 g

<152> 정제수를 가하여 전체 900 ml

<153> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강 음료 조성물 제조에 사용한다. 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

<154> 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 독활 및 승마 혼합생약추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 연골 조직 보호 효과, 소염 및 진통 효과를 나타내므로, 염증관련 질환, 특히 관절염의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.