



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년02월02일  
(11) 등록번호 10-0881369  
(24) 등록일자 2009년01월23일

(51) Int. Cl.<sup>9</sup>  
A61K 31/12 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)  
A61P 25/30 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2007-0085247  
(22) 출원일자 2007년08월24일  
심사청구일자 2007년08월24일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR100815868 B1  
KR1020050086978 A  
Toxicology, v.197 no.3, pp.239-251, 2004

(73) 특허권자  
대구한의대학교산학협력단  
경북 경산시 유곡동 290번지 대구한의대학교내  
(72) 발명자  
양재하  
대구 남구 봉덕동 715-6  
김상찬  
대구광역시 수성구 상동 178-1 청구중동아파트  
A-205  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
신동인

전체 청구항 수 : 총 4 항

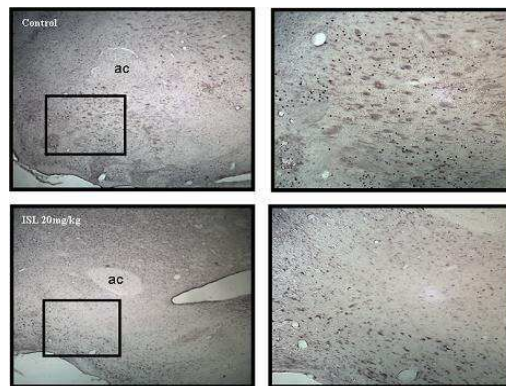
심사관 : 여경숙

(54) 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 유효성분으로 함유하는 약물 중독 및 금단 증상의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌(Isoliquiritigenin)을 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌은 약물중독의 지표로 사용되는 보행성 활동량 및 특정 지표 성분인 c-Fos 발현을 급격히 감소시켜 약물 중독 및 금단 증상의 예방 및 치료를 위한 약학조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**이종록**

대구 남구 이천동 214-456 이천강변타운 102동 10  
6호

**장은영**

대구 수성구 수성동4가 1020-26번지

**황미열**

대구 중구 대봉1동 55-3 청구맨션 A동 609호

**김상건**

서울 용산구 이촌1동 강촌아파트 102동 206호

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 유효성분으로 함유하는 코카인 중독 및 금단 증상의 예방 및 치료용 약학조성물.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 이소리퀴리티게닌은 조성물 총 중량에 대하여 0.02 내지 50% 중량백분율로 포함됨을 특징으로 하는 약학조성물.

**청구항 3**

감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 유효성분으로 함유하는 코카인 중독 및 금단 증상의 예방 및 개선용 건강기능식품.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제인 건강기능식품.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

<1> 본 발명은 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 유효성분으로 함유하는 약물 중독 및 금단 증상의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

- <2> [문헌 1] Wiechman BE et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 15(3), pp425-33, 1981
- <3> [문헌 2] Einhorn LC. et al., *J. Neurosci.*, 8(1), pp100-12, 1988
- <4> [문헌 3] Parada A., et al., *Neuropharmacology*, 39(9), pp1645-52, 2000
- <5> [문헌 4] Pontieri FE., et al., *Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, pp12304-8, 1995
- <6> [문헌 5] Kuczenski R et al., *J. Neurosci.*, 11(9), pp2703-12, 1991
- <7> [문헌 6] Harborne J.B., *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd Ed., pp6-7, 1998
- <8> [문헌 7] 대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협회의, 제 5 개정판, p33-48, 1989
- <9> [문헌 8] Kim YW et al., *Chem Biol Interact.*, 161(2), pp125-38, 2006
- <10> [문헌 9] Karasinska JM et al., *Eur Neurosce.*, 22(7), pp1741-50, 2005
- <11> [문헌 10] NATHALIE THIRIET et al., *Ann N Y Acad Sci.*, 914, pp46-57, 2000
- <12> [문헌 11] 이형철 외, 동의병리학회지, 15(4), pp543-47, 2001

**발명의 내용**

**해결하고자하는 과제**

<13> 과학문명의 발달과 급진하는 경제사회에 따른 현대인들의 잇따른 스트레스로 인해 약물중독의 확산은 가장 중요한 현대 사회문제 중의 하나이다. 약물이란 질병을 예방, 치료하는데 사용되는 물질을 지칭하며, 신체 기능의 변화를 일으키는 물질을 말한다. 이러한 약물의 남용은 부정적인 측면에서 신체적, 정신적, 사회적으로 자기 파괴의 문제를 발생시킨다. 약물중독은 아편이나 신경안정제 또는 알코올과 같은 약물에 대한 신체적인 반

응을 지칭한다. 이러한 약물중독은 내성, 금단증상 및 습관화의 현상을 가지는데, 약물의 사용으로 인한 통제력 상실을 의미하기도 한다. 최근의 약물남용은 청소년, 여성 약물남용자의 증가로 인한 세계적으로 심각한 정신질환 중의 하나로서, 중독성 약물에 대한 치료제의 개발은 시급한 현실이다. 이러한 약물중독의 해결책으로 여러 가지 사회정책 및 치료, 재활을 위한 프로그램이 이루어지고 있지만, 근본적인 치료대책으로서, 한계점을 가지고 있다.

<14> 코카인 (Cocaine), 암페타민 (Amphetamine), 모르핀 (Morphine) 등과 같은 중독성 약물들은 약물투여에 따른 보행성 활동량을 증가시킨다 (Wiechman BE et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 15(3), pp425-33, 1981). 따라서, 이러한 보행성 활동량은 약물중독의 지표로 사용되고 있다. 코카인은 약물강화효과를 통하여 탐닉현상이 생기는데, 이러한 행동적 변화에 영향을 주는 요인이 도파민 (Dopamine, DA) 신경전달계의 활성화이다. 특히, 코카인 투여로 인한 보상 및 강화작용은 복측 피개 영역 (Ventral tegmental area, VTA)의 A10 신경 (A10 neuron)에서 기시하여 측핵 (Nucleus accumbens)으로 투사되는 중뇌 변연계가 중요한 역할을 맡고 있다고 알려져 있다 (Einhorn LC. et al., *J. Neurosci.*, 8(1), pp100-12, 1988).

<15> 최근의 연구들을 보면 코카인의 투여로 인하여 약물 중독과 관련이 있는 측핵 및 선조체 등의 도파민성 신경세포의 투사부위에서 신경활성의 지표라고 알려진 초기 유전자 c-Fos (Immediate early gene c-Fos)의 단백질인 c-Fos발현이 증가되었다는 보고가 있다. 실험동물에 반복적으로 도파민 D1 수용체 효능제인 SKF-38393를 투여한 경우, 보행성 활동량과 신경활성도의 지표인 c-Fos의 발현이 증가되었다. 또한 도파민의 길항물질인 SCH 23390을 투여한 결과, 코카인에 의한 보행성 활동량이 줄어들었다 (Parada A., et al., *Neuropharmacology*, 39(9), pp1645-52, 2000). 생체내 (In vivo) 미세투석법 (Microdialysis)을 이용하여 관찰한 실험에서 약물 중독과 관련있는 부위인 선조체 및 측핵에서 코카인 투여로 인한 도파민의 농도는 현저하게 증가하였으며 (Pontieri FE., et al., *Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, pp12304-8, 1995), 이는 또한, 보행성 활동량이 증가를 보임으로써, 생화학적인 측면인 도파민과 행동학적인 측면인 보행성 활동량이 상관관계가 있음을 보여주는 실험적인 증거를 제시하였다 (Kuczenski R et al., *J. Neurosci.*, 11(9), pp2703-12, 1991).

<16> 따라서 약물의 중독성에 관여하는 신경기전의 규명이야말로 약물중독치료에 궁극적인 해답을 줄 수 있을 것이다.

<17> 본 발명의 감초(Glycyrrhiza uralensis)는 콩과에 드는 여러 해살이 풀로 중국 북부지방이 원산지라고 생각되며 중국, 시베리아, 이태리 남부, 만주, 몽고, 스페인 등지에 야생하거나 재배한다. 키는 90 cm쯤 자라고 있는 아카시아 잎이나 싸리 잎과 비슷하며 마주난다. 한 줄기에 작은 잎이 4~8쌍이 나란히 달린다. 8~9월에 잎 어귀에서 꽃대궁이 나와 연한 보랏빛 꽃이 달린다. 꽃이 진후에 꼬투리가 생기고 그 속에 씨를 맺는다. 꼬투리는 길이 1~1.5 cm쯤 되는 타원 꼴로 낫 모양으로 구부러져 있으며 곁에 가지 같은 밤색털이 뽁뽁하게 나 있고 그 안에 씨가 6~8개쯤 들어 있다. 품종으로는 우랄감초와 러시아감초, 이태리감초 등 서너 가지가 있는데 우랄감초가 단맛이 뛰어나고 품질이 제일 좋지만 수확량은 적다. 부식물이 많고 기름진 찰흙에서 잘 자라며 우리나라에서는 모든 지역에 재배할 수 있으나 중국북부, 만주, 시베리아 감초는 경기도나 강원도의 산간지방에서 재배하는 것이 좋고 따뜻한 곳을 좋아하는 이태리나 프랑스 남부지방 감초는 중남부 지방에 재배하는 것이 좋다. 감초는 가을이나 이른 봄에 길게 뺀 뿌리줄기와 땅속깊이 들어간 뿌리를 캐낸 다음 잔뿌리와 줄기를 다듬어 버리고 물로 씻어 햇볕에 말려 쓴다. 약재로 쓸 때에는 생것을 그대로 쓰기도 하고 누렇게 볶아서 쓰기도 한다. 감초는 뿌리를 벗기지 않은 것과 뿌리를 벗긴 것으로 나누어 쓴다. 껍질을 벗긴 감초는 겉면이 누른 밤색 또는 어두운 밤색이고 세로로 긴 주름이 있다. 어느 것이든 단맛과 함께 특이한 냄새가 나는데 진이 굳고 무거우며 단맛이 강한 것을 품질이 좋은 것으로 친다.

<18> 감초에는 주성분이 글리시리진과 만니트, 포도당이 6~14%, 아스파라긴, 단백질, 우레아제, 수지, 사카로스, 칼슘, 마그네슘, 펙틴 등이 들어 있고, 녹말도 14~30% 들어 있다. 정유와 알칼로이드도 조금 들어 있으며, 글리시리진은 뿌리보다 뿌리줄기에 3.5~6.5% 더 들어 있다. 이밖에 감초에는 리퀴리티토이드, 리퀴리티게닌, 아스코르빈산, 황색색소, 아스파라긴, 플라본 배당체, 리퀴리티, 에스트로젠, 아식향산 등이 들어 있다.

<19> 따라서, 본 발명에서는 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌이 보행성 활동량 및 c-fos 발현억제를 통해 급성 약물투여에 의한 약물강화작용을 저해시킴을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

**과제 해결수단**

<20> 상기 목적을 달성하기 위하여, 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 유효성분으로 함유하는 약물 중독 및 금단 증상의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

- <21> 또한 본 발명은, 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 유효성분으로 함유하는 약물 증독 및 금단 증상의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- <22> 본 발명의 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)의 알콜추출물로부터 분리되는 정제분획물의 단일성분 이소리퀴리티게닌을 분리하는 방법은 하기와 같다.
- <23> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <24> 본 발명의 감초 추출물은 감초를 음건하여 마쇄한 후, 건조된 감초의 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 5 내지 15배 분량의 물, 에탄올, 메탄올 등과 같은 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>4</sub>의 저급알콜 또는 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.2 내지 1:5의 혼합비(kg/ℓ)를 갖는 이들의 혼합용매로, 실온에서 약 1 내지 24시간, 바람직하게는 2 내지 8시간 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 냉침 추출한 후 감압 농축함으로써 본 발명의 가용 추출물인 조추출물을 수득할 수 있다.
- <25> 또한 본 발명의 유효성분이 정제된 정제분획물은 상기 극성 용매 가용추출물을 분획하고 농축한 후, 실리카겔 컬럼크로마토그래피 및 박층컬럼크로마토그래피를 이용하여 분리 할 수 있다.
- <26> 이하 구체적으로 감초 추출물 및 정제분획물의 분리 공정을 설명하면,
- <27> 예를 들어 감초를 분쇄하고 물, 메탄올 또는 에탄올과 같은 극성 용매로 추출한 후에 감압 농축하여 극성용매에 가용한 조추출물을 얻는 제 1단계;
- <28> 상기 단계에서 얻은 조추출물을 컬럼 크로마토그래피 및 TLC를 수행하는데, 상기 실리카겔컬럼에 클로로포름 : 메탄올 ( 100:0 ~ 0:100(w/w)) 전개용매에서 처음에는 클로로포름만 전개시키고 점차적으로 메탄올의 농도를 순차적으로 높여가는 농도구배 전개용매를 컬럼에 전개시켜 분획 후, TLC상에서 R<sub>f</sub>치가 0.4 내지 0.5를 갖는 분획끼리 모아 단일분획을 만들고 건조하여 정제된 형태의 흰색 분말의 리퀴리티닌을 얻는 제 2단계를 포함한다.
- <29> 또한, 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다(Harborne J.B., *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd Ed., pp6-7, 1998).
- <30> 상기 단계에서 얻은 리퀴리티닌을 DMSO에 녹이고 1N HCl을 넣어 60 내지 140℃, 바람직하게는 80 내지 120℃의 추출 온도에서 0.5 내지 48시간, 바람직하게는 2 내지 10시간 동안 중탕가열하여 리퀴리티닌을 산가수분해하여 당 성분을 분리한 후, 산성분을 중화시키기 위하여 동량의 1N NaOH를 가하여 통상적인 분획 공정을 통하여, 이소리퀴리티게닌을 수득할 수 있다.
- <31> 또한, 감초는 오랫동안 식용되거나 생약으로 사용되어 오던 약재로서 이로부터 추출된 본 발명의 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.
- <32> 본 발명의 약물 증독 및 금단증상의 치료 및 예방을 위한 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 0.02 내지 50 % 중량백분율로 포함한다.
- <33> 본 발명의 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- <34> 본 발명의 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- <35> 본 발명에 따른 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 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. 감초 정제분획물의 단일성분인 이소리퀴리티게닌을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 추출물 및 정제분획물에 적어도 하

나 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, 비수성용제, 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 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<36> 본 발명의 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌의 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 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌은 1일 0.0001 내지 100mg/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.

<37> 본 발명의 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌은 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.

<38> 또한, 본 발명은 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌을 유효성분으로 함유하는 약물 중독 및 금단 증상의 예방 및 치료를 위한 건강기능식품을 제공한다.

<39> 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.

<40> 본 발명의 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 치료를 위한 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물 및 분획물을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함한다.

<41> 또한, 약물 중독 및 금단증상의 예방 및 치료를 위한 목적으로 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.

<42> 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 적당한 방법으로 과립상으로 한 다음 활택제 등을 넣어 압축성형하여 조제하거나 정제 형태의 건강기능식품을 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 직접 압축성형하여 만들거나 또는 미리 만든 과립에 건강기능식품을 그대로 혹은 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 다음 압축성형하여 조제하거나 건강기능식품에 부형제, 결합제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 분말을 용매로 습윤시키고, 습윤된 분말을 저압으로 틀에 넣어서 성형한 후, 적당한 방법으로 건조하여 조제한다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품에 필요에 따라 교미제 등을 넣을 수 있으며, 적당한 제피제로 제피 가능하다.

<43> 상기 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 보통 캡셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 고르게 섞은 것 또는 적당한 방법으로 입상으로 한 것 또는 입상으로 한 것에 적당한 제피제로 제피한 것을 그대로 또는 가볍게 성형하여 충전하여 조제하며, 연질캡셀제는 보통 캡셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 넣은 것을 젤라틴 등 적당한 캡셀기체에 글리세린 또는 소르비톨 등을 넣어 소성을 높인 캡셀기체로 피포하여 일정한 형상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 상기 캡셀기체에 착색료 보존료 등을 첨가할 수 있다.

<44> 환형태의 건강기능식품은 보통 건강기능식품에 부형제, 결합제, 붕해제 등을 고르게 섞은 다음 적당한 방법으로 구상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

<45> 과립형태의 건강기능식품은 보통 건강기능식품을 그대로 또는 건강기능식품에 부형제, 결합제, 붕해제 등을 넣어 고르게 섞은 다음 적당한 방법으로 입상으로 만들고 될 수 있는 대로 입자를 고르게 한 것이며, 필요에 따라 착향료, 교미제 등을 넣을 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μm), 14호 (1410 μm) 및 45호 (350 μm) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것은 전체량의 5.0

%이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하이어야 한다.

- <46> 본원 발명의 상기 부형제, 결합제, 봉해제, 활택제, 교미제, 착향료 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- <47> 본 발명은 약물 중독 및 금단증상의 완화 효과를 나타내는 상기 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강보조식품을 제공한다. 감초 정제분획물의 단일성분인 이소리퀴리티게닌을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- <48> 또한, 약물 중독 및 금단증상의 완화 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 이소리퀴리티게닌의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- <49> 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 이소리퀴리티게닌을 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, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- <50> 상기 외에 본 발명의 이소리퀴리티게닌은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 이소리퀴리티게닌은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

**효 과**

- <51> 본 발명의 감초로부터 분리된 이소리퀴리티게닌은 흰쥐의 보행성 활동량, 흰쥐의 측핵 내 c-fos 발현억제를 나타내는 바, 약물중독 및 금단증상의 예방 및 치료용 약화조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

- <52> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- <53> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <54> **실시예 1. Isoliquiritin의 제조**
- <55> 1-1. 감초 추출물 및 Liquiritin의 분리
- <56> 음건 세절한 감초 3 kg에 15 l의 100 % 메탄올을 가하고 상온에서 72시간 동안 추출하고 여과하였다. 여과한 여액을 가온감압농축하여 갈색 가공품 290 g을 얻었다. 여과물은 실리카 겔 칼럼크로마토그래피(60 cm 230-400 mesh, 1.2 kg)에 로딩하고, 그런 후 6 L의 클로로포름을 흘린 후, 클로로포름-메탄올(CHCl<sub>3</sub>-MeOH[50:1 (6 L), 30:1 (6 L), 15:1 (15 L)]) 경사로 분리하였다. 클로로포름-메탄올 15:1 (15 L) 분획을 감압농축하여 짙은 갈색의 소분획물 43 g을 얻었다. 이 추출물은 다시 클로로포름-아세톤(CHCl<sub>3</sub>-acetone[20:1 (6 L), 10:1 (5 L), 4:1 (5 L), 그런 후 1:1 (5 L)]) 경사의 용매조합을 이용하여, 2차 실리카 겔 칼럼크로마토그래피(50 cm 230-400 메쉬, 350 g)를 실시하여 다시 소분획물로 나누었다. 2차 실리카 겔 칼럼크로마토그래피로부터 분리된 소분획물들 중 32-67번 분획물들은 Liquiritin이 [Rf=0.41, CHCl<sub>3</sub>-acetone(1:1)] 풍부한 분획물들로 확인 되어

이들을 농축하여 Liquiritin이 풍부한 황색의 분획물을 얻었다(27g). 더욱 순도가 높은 Liquiritin을 정제하기 위해 분획을 실리카 겔 칼럼크로마토 그래피(50 cm 230-400 매쉬, 200 g)를 클로로포름-메탄올(CHCl<sub>3</sub>-MeOH) 용매조합으로 실시하여 정제된 흰색 분말의 Liquiritin 22g을 수득하였다.

<57> 1-2. Isoliquiritigenin의 제조 및 분리

<58> 이소리퀴리티게닌은 상기 참조예 1에서 수득된 리퀴리틴의 가수분해도중 생성되는 부산물을 분리 정제하여 얻었다. 간단히 설명하면, 리퀴리틴을 DMSO에 녹이고 여기에 1N HCl 200ml을 넣어 100℃로 6시간 중탕가열하여 리퀴리틴을 산가수분해 하여 당성분을 분리하였다. 산성분을 중화시키기 위하여 동량의 1N NaOH 200ml를 가하여 리퀴리티게닌과 이소리퀴리티게닌을 제조하였다. 산가수분해 중 발생하는 당성분과 소금등 불순물들을 제거하기 위하여 클로로포름-아세톤 용매조합을 사용하여 실리카 겔 칼럼크로마토그래피(50 cm 230-400 매쉬, 200g)를 실시하여 리퀴리티게닌과 이소리퀴리티게닌의 혼합물 12 g을 얻었다.

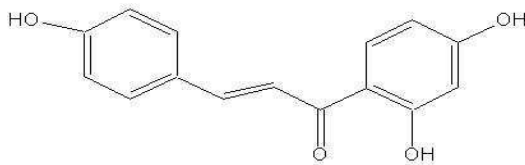
<59> 이소리퀴리티게닌의 정제 분리를 위하여 회수용 HPLC (칼럼: GS-310, jai)를 이용하여 MeOH/ACN=4/1의 용매조합으로 용출시켜 순수한 이소리퀴리티게닌을 4 g을

<60> 얻었다.

<61> 여기에서 얻은 정제 구조식의 이소리퀴리티게닌의 순도를 확인하기 위해 UPLC(waters)와, LC-MS(waters)를 이용하여 표준품과 비교 분석 하였다(Kim YW et al., *Chem Biol Interact.*, 161(2), 125-38, 2006).

**화학식 1**

<62> 이소리퀴리티게닌 구조식



<63>

<64> **참고예 1. 실험동물의 준비**

<65> 실험동물은 체중 250-260 g의 스프라그-다우리 (Sprague-Dawley)계 수컷 랫트 (효창사이언스 사)를 사용하였고, 대구한의대학교 동물사육실에서 일정한 조건 (온도: 21± 2, 명암: 12시간 명암주기)에서, 사료와 음수의 자유로운 섭취가 가능하도록 하였으며, 실험시작 전까지 물과 먹이를 충분히 제공하며 실험시작 전에 실험동물을 3일 동안 하루에 10분씩 사전취급 (Handling) 한다.

<66> **참고예 2. 통계처리**

<67> 실험성적은 보행성 활동량을 박스 내에서 수평이동거리 (cm)로, 면역조직분석화학법은 c-fos 발현 세포수로 통계적 유의성은 SPSS 프로그램 (Version 11.01)의 원웨이(One-way) ANOVA로 검정하여 p값이 0.05이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.

<68> **실험예 1. 급성 약물 투여에 의한 보행성 활동량 변화에 대한 이소리퀴리티게닌의 효과**

<69> 상기 실시예에서 얻은 이소리퀴리티게닌의 약물 투여에 의한 행동학적 변화를 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다(Karasinska JM et al., *Eur Neurosci.*, 22(7), pp.1741-50, 2005).

<70> 실험동물을 사육장에서 외부소음이 차단된 실험실로 옮겨 각각 무게를 잰 후 가로 40cm, 세로 40cm, 높이 45cm인 9개의 활동량 측정상자에 개별적으로 넣어졌다. 상자 내에서 60분간의 적응시간 (adaptation)을 거친 후, 다시 60분간의 기저활동량 (baseline)이 측정하였고, 기저활동량 측정기간이 끝난 후 이소리퀴리티게닌 농도 20, 10, 5 mg/kg을 각각 1회 경구 투여하였으며, 대조군으로 2 ml/kg의 5% Tween 80을 경구 투여하였다. 경구투여 60분 후 코카인 20 mg/kg를 복강 주사 한 후, 추가적으로 60분 동안 보행하였다.

<71> 실험결과, 도 1에서 나타내는 바와 같이, 5% Tween 80 투여 후 코카인을 처치한 대조군에서 최고 13280.9 ± 1845.4 cm까지 증가한데 반해, 실시예 이소리퀴리티게닌 20 mg/kg, 10 mg/kg, 5 mg/kg 투여군의 경우 각각 5849.4± 846.3, 8630.4± 1694.5, 11509.4 ± 2386.9 cm 증가하여 대조군에 비해 보행성 활동량이 감



소하였으며, 이소리퀴리티게닌 20 mg/kg투여군은 대조군에 비해 유의하게 감소되었음을 확인하였다 (표 1참조).

**표 1**

<72> 약물 투여로 인한 흰쥐의 보행성활동량에 대한 이소리퀴리티게닌의 효과

Group	cocaine 투여 후 1시간 보행성 활동량
정상군	1426.4±210.7
대조군	13280.9±1845.4
이소리퀴리티게닌 20 mg/kg	5849.4±846.3
이소리퀴리티게닌 10 mg/kg	8630.4±1694.5
이소리퀴리티게닌 5 mg/kg	11509.42±2386.9

<73> 실험예 2. 급성 약물 투여에 의한 면역조직화학분석법에 의한 c-Fos발현 감소에 대한 이소리퀴리티게닌의 효과

<74> 상기 실시예에서 얻은 이소리퀴리티게닌의 약물 투여에 의한 초기유전자 c-fos 발현을 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다(NATHALIE THIRIET et al., *Ann N Y Acad Sci.*, 914, pp.46-57, 2000).

<75> 실험당일 검사단계에서 이소리퀴리티게닌 20 mg/kg 경구투여 1시간 후 코카인 20 mg/kg를 복강 투여하고 그로부터 2 시간 뒤 소듐펜토바비탈(sodium phentobarbital - 100 mg/kg)로 마취시킨 후, 심장을 통해 500 ml의 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)로 혈액을 관류시켜 뇌 조직을 고정시켰다. 뇌 조직을 꺼낸 후 10% sucrose/4% PFA에 2시간 고정시킨 다음, 20% sucrose/PBS에 담귀 하루 동안 4℃ 냉장 상태로 유지하였다. 그 다음 -20℃상태에서 크라이오톰(cryotome)(Shandon Cryotome, Thermo Fisher Scientific)으로 30 um두께로 뇌 조직을 절편하여 측핵 부위를 취하여 0.1% 아지드나트륨/완충용액(sodium azide/PBS)에 넣어 4℃에 보관하였다.

<76> 조직절편은 완충용액(PBS)에 3회 세척하여 2% Triton-X-100/PBS에서 5분간 세포막의 지질을 제거하는 과정을 거친 후 3% BSA/PBS로 blocking하였다. 그리고 0.1% BSA/PBS에 1:2000으로 희석된 1차 rabbit anti-Fos antibody (Santa cruz, CA, USA)를 이용하여 4℃에서 20시간 반응시킨 후, 발색제로 DAB를 사용하여 c-Fos protein을 발현시켰다.

<77> 실험결과, 도 2에서 나타내는 바와 같이 이소리퀴리티게닌 20 mg/kg이 처리된 조직절편에서는 처리하지 않은 조직절편보다 c-Fos의 유전자의 발현이 급격히 감소되었음을 확인하였다(표 2참조).

**표 2**

<78> 약물투여로 인한 흰쥐의 면역조직염색법에 의한 c-fos 발현에 대한 이소리퀴리티게닌의 효과

Group	c-Fos 발현
대조군	189
ISL 20 mg/kg	27

<79> 실험예 3. 급성독성실험

<80> 상기 실시예에서 얻은 이소리퀴리티게닌의 약물 투여에 의한 독성을 확인하기 위하여 기존문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다 (이형철 외, *동의병리학회지*, 15(4), pp543-47, 2001).

<81> 6 주령의 특정병원체부재 (Specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 각 그룹당 2마리씩의 동물에 본 발명의 이소리퀴리티게닌을 500 mg/kg의 용량으로 1회 경구투여 하였다. 실험물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 강장기와 흉강 장기의 이상여부를 관찰하였다.

<82> 그 결과, 실험 물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중 변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

<83> 실험결과, 본 발명의 이소리퀴리티게닌은 랫트에서 각각 500 mg/kg 까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량 (LD<sub>50</sub>)은 500 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

<84> 하기에 본 발명의 이소리퀴리티게닌을 함유하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<85> **제제예 1. 산제의 제조**

<86>	이소리퀴리티게닌	300 mg
<87>	유당	100 mg
<88>	탈크	10 mg

<89> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

<90> **제제예 2. 정제의 제조**

<91>	이소리퀴리티게닌	300 mg
<92>	옥수수전분	100 mg
<93>	유당	100 mg
<94>	스테아린산 마그네슘	2 mg

<95> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<96> **제제예 3. 캡슐제의 제조**

<97>	이소리퀴리티게닌	300 mg
<98>	결정성 셀룰로오스	3 mg
<99>	락토오스	14.8 mg
<100>	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

<101> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<102> **제제예 4. 주사제의 제조**

<103>	이소리퀴리티게닌	300 mg
<104>	만니톨	180 mg
<105>	주사용 멸균 증류수	2974 mg
<106>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	26 mg

<107> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<108> **제제예 5. 액제의 제조**

<109>	이소리퀴리티게닌	300 mg
<110>	이성화당	10 g
<111>	만니톨	5 g
<112>	정제수	적량

<113> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색 병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<114> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<115>	이소리퀴리티게닌	1000 mg
<116>	비타민 혼합물	적량
<117>	비타민 A 아세테이트	70 µg
<118>	비타민 E	1.0 mg
<119>	비타민 B <sub>1</sub>	0.13 mg
<120>	비타민 B <sub>2</sub>	0.15 mg
<121>	비타민 B <sub>6</sub>	0.5 mg
<122>	비타민 B <sub>12</sub>	0.2 µg
<123>	비타민 C	10 mg
<124>	비오틴	10 µg
<125>	니코틴산아미드	1.7 mg
<126>	엽산	50 µg
<127>	판토텐산 칼슘	0.5 mg
<128>	무기질 혼합물	적량
<129>	황산제1철	1.75 mg
<130>	산화아연	0.82 mg
<131>	탄산마그네슘	25.3 mg
<132>	제1인산칼륨	15 mg
<133>	제2인산칼슘	55 mg
<134>	구연산칼륨	90 mg
<135>	탄산칼슘	100 mg
<136>	염화마그네슘	24.8 mg

<137>        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.

<138>        **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<139>	이소리퀴리티게닌	300 mg
<140>	비타민 C	15 g
<141>	비타민 E(분말)	100 g
<142>	젖산철	19.75 g
<143>	산화아연	3.5 g
<144>	니코틴산아미드	3.5 g
<145>	비타민 A	0.2 g
<146>	비타민 B <sub>1</sub>	0.25 g
<147>	비타민 B <sub>2</sub>	0.3g

<148> 물 정량

<149> 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.

<150> 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

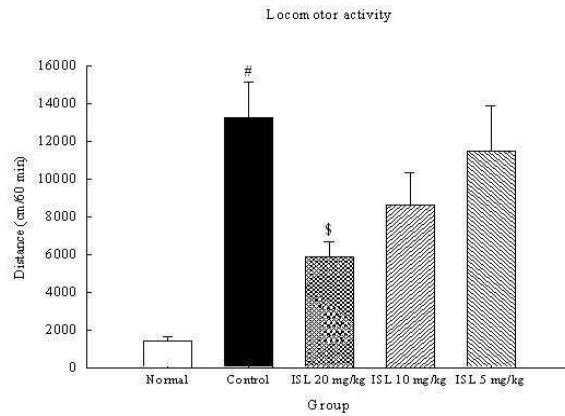
**도면의 간단한 설명**

<151> 도 1은 약물 투여로 인한 흰쥐의 보행성 활동량에 대한 이소리퀴리티게닌의 효과를 나타낸 도이며,

<152> 도 2는 약물 투여로 인한 흰쥐의 측핵 내 c-fos 발현에 대한 이소리퀴리티겐의 효과를 나타낸 도이다.

**도면**

**도면1**



**도면2**

