



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월29일

(11) 등록번호 10-1522273

(24) 등록일자 2015년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/9066 (2006.01) A61P 13/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0115996

(22) 출원일자 2013년09월30일

심사청구일자 2013년09월30일

(65) 공개번호 10-2015-0038775

(43) 공개일자 2015년04월09일

(56) 선행기술조사문헌

JP09255568 A*

KR1020110069975 A*

JP2013144659 A

CN102225181 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

(주)산들촌

전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9

수원대학교산학협력단

경기도 화성시 봉담읍 와우안길 17 (수원대학교)

재단법인 전남생물산업진흥원

전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)

(72) 발명자

이유현

서울 강남구 언주로 203, 1005호 (도곡동, 매봉아파트)

차민석

전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

전체 청구항 수 : 총 2 항

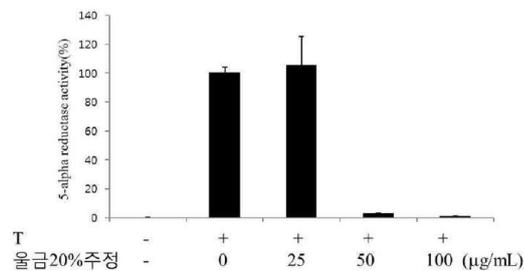
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 울금 추출물을 포함하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 울금 추출물이 전립선 비대 유도 백서와 전립선 세포에서 in vitro 및 in vivo에서 제2형 5-알파 리덕타아제를 저해하며, 전립선 무게 감소효과를 나타냄을 확인함으로써 전립선 비대증의 치료 및 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



5-alpha reductase activity of *Curcuma aromatica* SALISB in rat prostate homogenate. Data are expressed as mean ± S.D.

(72) 발명자

김용재

광주 남구 호사랑길 14, 107동 907호 (봉선동, 포스코더샵아파트)

전우진

광주 북구 설죽로 595, 106동 1703호 (일곡동, 롯데아파트)

김선오

광주 북구 양일로 52, 201동 1003호 (연제동, 연제2차대주피오레)

이정민

경기도 수원시 영통구 영통동 1023번지 메가플러스 906호

황권택

광주 광산구 신창로161번길 34, 319동 605호 (신창동, 신창3차부영사랑으로아파트)

이정윤

경기도 화성시 봉담읍 안녕북길 111-5 3층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20114007
부처명	농림수산식품부
연구관리전문기관	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	기술사업화지원사업
연구과제명	난대성 특화작물 산업화 연구단
기여율	1/1
주관기관	한국인스팜주식회사
연구기간	2011.11.03 ~ 2014.11.02

명세서

청구범위

청구항 1

울금(Curcuma aromatica SALISB) 재료를 동결 건조하여 마쇄한 후 시료 중량의 2 내지 20배에 달하는 부피의 물 또는 1 내지 30%(v/v) 물 및 주정 혼합용매로 30 내지 80℃에서 2 내지 12시간 동안에서 열수 추출하여 추출한 후 감압여과 및 농축하여 제조된 울금(Curcuma aromatica SALISB) 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증의 예방 및 치료를 위한 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

울금(Curcuma aromatica SALISB) 재료를 동결 건조하여 마쇄한 후 시료 중량의 2 내지 20배에 달하는 부피의 물 또는 1 내지 30%(v/v) 물 및 주정 혼합용매로 30 내지 80℃에서 2 내지 12시간 동안에서 열수 추출하여 추출한 후 감압여과 및 농축하여 제조된 울금(Curcuma aromatica SALISB) 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] [문헌 1] Assinder, SJ, Prostate. 68:115-121 (2008)

[0003] [문헌 2] Tubaro A. et al. Drug Aging 20(3):185-195, 2003

[0004] [문헌 3] Zhu YS et al. Steroid enzyme and Cancer 1155:43-56, 2009

[0005] [문헌 4] Ryuat al.. Applied chemistry, 9: 57-60 (2005)

[0006] [문헌 5] 김창렬. 식품의약품안전처, pp 1-98 (2006)

[0007] [문헌 6] Chatterjee, S. et al, Food Research International. 32:487-490. 1999.

[0008] [문헌 7] Pilar P, Adv Ther, 27(8):555-563, 2010

[0009] [문헌 8] Silverio FD et al. Prostate, 1998, 37:77-83; Shin IS et al., 2012, Food Chem Toxicol 50:884-

888).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.
- [0011] 본 발명은 울금 추출물을 함유하는 전립선비대 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 울금 추출물이 전립선 비대 유도 백서와 전립선 세포에서 in vitro 및 in vivo에서 제2형 5-알파 리덕타아제를 저해하며, 전립선 무게 감소효과를 나타냄으로 의약품 및 건강식품의 소재로서 유용하게 사용될 수 있는 울금 추출물의 새로운 용도에 관한 것이다.
- [0012] 전립선 비대증은 우리나라 남성의 50세 이후 발병이 급격히 일어나는 남성질환으로 최근 우리나라에서 전립선비대증 질환자의 증가율이 년 20%를 상회할 정도로 가파른 증가를 하고 있다. 이 질환의 경우 전립선이행대 부분의 평활근(smooth cell)과 상피세포(epithelial)의 과도한 증식으로 야기되며, 방광폐색으로 인한 다양한 배뇨장애가 일어난다. 전립선 비대의 한 가지 기전은 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone,T)과 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)이 관련되어 있다고 알려져 있다.
- [0013] 남성호르몬에 속하는 T는 전립선내의 5-알파 리덕타아제(5- α -reductase, 5 α RD)에 의하여 활성형 DHT로 전환되며, 전환된 DHT는 안드로젠 수용체(androgen receptor, AR)와 복합체를 이루고 핵 내로 이동하여 전사가 진행된다. 이러한 과정에서 활성형 남성호르몬의 전환에 관여하는 효소인 5 α RD는 type1과 type2 두 종류가 존재하는데, 5 α RD type1은 전립선에서의 분포와 활성은 크지 않지만 간과 피부에 많이 존재하며, 5 α RD type2의 경우는 주로 전립선에서 두드러진 활성과 분포를 보인다. 이들 효소는 정상적인 전립선에도 분포하고 있으나, 전립선비대의 경우 비대해진 부위에서 과발현을 보인다. 그러므로, 5 α RD의 활성을 억제하는 5 α RD inhibitor의 개발은 전립선약물치료의 큰 축을 담당하고 있으며, 전립선치료제로 개발되어 있는 Finasteride의 경우가 5 α RD type2를 억제하는 것으로 serum에서 70%, 전립선에서 90%정도 억제할 수 있으며, type 1의 친화성도 낮추는 역할을 할 수 있다(Assinder, SJ, Prostate. 68:115-121 (2008); Tubaro A. et al. Drug Aging 20(3):185-195, 2003;Zhu YS et al. Steroid enzyme and Cancer 1155:43-56, 2009).
- [0014] 울금(Curcuma aromatica SALISB.)은 생강과에 속하는 다년생 초목으로서 원산지는 인도, 중국 및 일본 등이고, 고온다습한 남부 아시아, 아프리카 및 중남미에서 자생하고 있으며 동인도 지방에서 재배가 시작되었다고 알려져 있다 (Ryuat al., Applied chemistry, 9: 57-60 (2005)). 울금은 한약재, 향신료 및 식용으로, 열대지방의 남아시아와 동남아시아에서 오랜 기간 동안 사용되어 왔는데, 울금의 가루나 추출액은 "본초강목"과 "동의보감"등의 고서나 기타 동물 실험에서 이담작용, 위액 분비 촉진 작용, 이뇨 작용, 해독 기능, 항암 작용, 항염 작용 및 항산화 작용 등이 알려져 있다 (김창렬. 식품의약품안전처, pp 1-98 (2006)). 또한, 울금의 뿌리, 줄기의 성분은 항산화와 세포보호 역할을 수행하는데, 주성분은 커큐민 (curcumin)과 커큐민(curcumin) 유도체 및 아로마틱 튜메론 (Aromatic turmerone)으로 알려져 있다(Chatterjee, S. et al., Food Research International. 32.487-490. 1999.).
- [0015] 그러나, 상기 문헌의 어디에도 울금 추출물의 전립선 비대증에 치료효과에 대하여 언급되거나 개시된 바는 없다.
- [0016] 본 발명의 울금 추출물은 전립선 비대 유도 백서와 전립선 세포에서 in vitro 및 in vivo에서 제2형 5-알파 리덕타아제를 저해하며, 전립선 무게 감소효과를 나타냄으로, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 약학조성물을 제공한다.
- [0018] 본원에서 정의되는 상기 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 극성용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 1 내지 30%(v/v) 물 및 주정 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.

- [0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명의 울금 재료를 동결 건조하여 마쇄한 후 시료 중량의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 2 내지 20배에 달하는 부피의 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 극성용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 1 내지 30%(v/v) 물 및 주정 혼합용매로 20 내지 120℃, 바람직하게는 30 내지 80℃에서 약 1 내지 72시간, 바람직하게는 2 내지 12시간 동안에서 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 열수 추출하여 추출한 후 감압여과 및 농축하여 본 발명의 울금 추출물들을 수득할 수 있다.
- [0021] 상기와 같은 방법으로 얻은 본 발명의 울금 추출물이 전립선 비대 유도 백서와 전립선 세포에서 *in vitro* 및 *in vivo*에서 제2형 5-알파 리덕타아제를 저해하며, 전립선 무게 감소효과를 나타냄을 확인함으로써 전립선 비대증의 치료 및 예방에 효과적임을 확인할 수 있었다.
- [0022] 따라서, 본원 발명은 상기 제조방법 및 상기 제조방법으로 제조된 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 약학조성물 또는 건강기능식품을 제공한다.
- [0023] 또한, 울금 추출물은 오랫동안 식용되거나 생약으로 사용되어 오던 약재로서 이로부터 추출된 본 발명의 추출물들 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.
- [0024] 상기 본 발명의 추출물을 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료용 약학조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 50 % 중량백분율로 포함한다.
- [0025] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 추출물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0027] 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. 추출물을 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 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 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 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (Witepsol), 마크로골, 트윈 (Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0028] 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.
- [0029] 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.

- [0030] 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, 한국약학대학 협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- [0031] 또한, 본 발명은 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.
- [0032] 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.
- [0033] 본 발명의 전립선 비대증 예방을 위한 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.01 내지 95%, 바람직하게는 1 내지 80% 중량백분율로 포함한다.
- [0034] 또한, 전립선 비대증 예방을 위한 목적으로 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.
- [0035] 본 발명은 전립선 비대증의 개선 및 예방 효과를 나타내는 상기 울금 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강보조식품을 제공한다. 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0036] 또한, 전립선 비대증의 예방 및 개선 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 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 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 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.
- [0038] 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 시료는 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 시료 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

- [0039] 상술한 바와 같이, 본 발명의 울금 추출물이 전립선 비대 유도 백서와 전립선 세포에서 in vitro 및 in vivo에서 제2형 5-알파 리덕타아제를 저해하며, 전립선 무게 감소효과를 나타냄을 확인함으로써 전립선 비대증의 치료 및 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 울금 추출물의 래트 전립선 균질물에서 in vitro 상에서 5-알파-리덕타아제 활성을 나타내는 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.으로 표기함);
- 도 2는 울금 열수 추출물의 래트 전립선 균질물에서 in vitro 상에서 5-알파-리덕타아제 활성을 나타내는 도이

며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.으로 표기함);

도 3은 울금 20% 주정 추출물의 래트 전립선 균질물에서 in vitro 상에서 5-알파-리덕타아제 활성을 나타내는 도이며(여기에서, 데이터는 평균(mean) ± S.D.으로 표기함);

도 4는 전립선배대증을 유도한 래트에서의 울금 추출물의 경구투여시의 in vivo 상에서 5-알파-리덕타아제 억제 활성을 나타내는 도이며,

도 5는 전립선배대증을 유도한 래트에서의 울금 추출물의 경구투여시의 in vivo 상에서 SRD5A2 수준에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 본 발명을 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0042] 단, 하기 실시예, 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0043] **실시예 1. 울금 추출물의 제조**

[0044] 다양한 추출용매를 이용한 울금 추출물의 제조는 다음과 같은 방법으로 실시하였다.

[0045] 1-1. 울금 80% 주정 추출물의 제조

[0046] 울금(하늘땅바다, 전남 진도군)을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 30kg을 건조하여 추출/농축기(1ton, (주)명일이엔지)에서 정제수 60L, 및 주정 240L를 투입하고 75 °C에서 5시간 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, (주)명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 정제수 100L를 투입하여 25 Brix로 2차 농축하고 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 울금 80% 주정 추출물 2,550g을 수득하여 하기 실험예 시료로 사용하였다.

[0047] 1-2. 울금 20% 주정 추출물의 제조

[0048] 울금(하늘땅바다, 전남 진도군)을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 30kg을 건조하여 추출/농축기(1ton, (주)명일이엔지)에서 정제수 240L, 및 주정 60L를 투입하고 95 °C에서 5시간 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, (주)명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 정제수 100L를 투입하여 25 Brix로 2차 농축하여 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 울금 20% 주정 추출물 2,490g을 수득하여 하기 실험예 시료로 사용하였다.

[0049] 1-3. 울금 실온 물 추출물의 제조

[0050] 울금(하늘땅바다, 전남 진도군)을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 30kg을 건조하여 추출/농축기(1ton, (주)명일이엔지)에서 정제수 300L를 투입하고 실온에서 70rpm으로 교반하면서 24시간 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, (주)명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 울금 물 추출물 2,400g을 수득하여 하기 실험예 시료로 사용하였다.

[0051] 1-4. 울금 열수 물 추출물의 제조

[0052] 울금(하늘땅바다, 전남 진도군)을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 30kg을 건조하여 추출/농축기(1ton, (주)명일이엔지)에서 정제수 300L를 투입하고 100 °C에서 5시간 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, (주)명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 울금 물 추출물 2,730g을 수득하여 하기 실험예 시료로 사용하였다.

[0053]

실험예 1: in vitro 전립선 비대억제실험

[0054]

상기 실시예 시료들의 in vitro에서 전립선 비대증에 대한 억제활성을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Pilar P, 2010, Adv Ther, 27(8):555-563).

[0055]

전립선비대에서 과활성화되어 testosterone(T)를 DHT로 전환시키는 효소인 5-alpha reductase II에 대한 억제 효과를 측정하기 위해 5-alpha reductase II의 발현이 높은 래트의 전립선을 적출하여 실험에 사용하였다. 12주령의 Sprague-Dawley(SD) 래트(샘타코, 대한민국)의 전립선을 적출하여 무게의 8배의 인산완충용액(Phosphate buffer, pH 7.4, 10mM)을 첨가한 후 4℃를 유지하는 환경에서 Ultra-Turrax(T10 basic, IKA, Germany)로 1분간 균질화하였다. 균질액은 4℃에서 5,000rpm으로 5분간 원심분리(Biofuge stratos, Kendro Laboratory Products, Germany) 하여 상등액을 취하여 효소원으로 사용하였다. 4종류 울금 추출물은 실험예 1의 결과로부터 50 μg/mL의 농도를 적용하였으며 5-alpha reductase II의 저해능을 측정하기 위해서 ELISA assay(Cusabio, Germany)를 이용하였다.

[0056]

상기 실험 결과, 울금 실은 물추출물(CW), 열수추출물(HW), 20% 주정추출물(20% EtOH), 80% 주정추출물(80% EtOH)의 5-alpha reductase 활성은 도 1과 같다. 본 활성은 testosterone을 처리한 군의 값을 standard곡선에 의해 pg/mL로 환산하고 이를 100%로 보았을 때 각 추출물을 처리한 군의 상대적인 값을 나타내었으며, 낮은 값을 보일수록 억제활성이 뛰어나다고 해석하였다. 50μg/mL에서 20% 주정추출물과 열수추출물은 각각 1% 및 17.7%의 낮은 5-alpha reductase활성을 보였으며, 이 두 추출물을 선택하여 0, 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 실험한 결과, 울금 열수추출물은 100 μg/mL에서 1.8%의 낮은 5-alpha reductase 활성을 보였고(도 2), 울금 20% 추출물은 50 μg/mL에서부터 3.2%, 100 μg/mL에서는 1.3%로 낮은 활성을 보였다(도 3).

[0057]

실험예 2: in vivo 상에서 전립선 비대증 억제활성 실험

[0058]

상기 실시예 시료들의 in vivo 상에서 전립선 비대증 저해활성을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Silverio FD et al. Prostate, 1998, 37:77-83; Shin IS et al., 2012, Food Chem Toxicol 50:884-888).

[0059]

2-1. SD래트의 전립선비대 유도

[0060]

상기의 실험예 1의 실험 결과를 바탕으로 전립선비대를 유도한 래트에서 울금 열수추출물 및 20% 울금 주정추출물을 대상으로 실험을 시행하였다. 5주령의 웅성 래트(대한바이오, 충북 음성군)를 구입하여 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 온도 23 ± 2 °C, 상대습도 55 ± 5%, 명암교대는 약 12시간으로 하였으며 사료와 물은 자유로이 섭취하게 하였다. 실험동물은 사육상자 당 2마리씩 수용하였으며 무게측정과 배당교환은 3일에 한번씩 실시하여 관리하였다. 실험동물은 일주일의 안정화기간을 거쳐서 실험에 사용되었다. 일주일의 안정화 기간 후 intrinsic testosterone의 영향을 배제하기 위하여 거세(castration)을 시행하였다.

[0061]

실험동물을 에테르 등으로 마취시킨 후 배면이 수술자를 향하게 눕혀 고정하고 음낭 끝 부위의 피부를 절개하여 좌우 고환 및 부고환을 잘라낸 후 절개면을 봉합하여 수술을 실시하였다. 본 거세술은 식약청의 수컷 성선비대 반응 시험법을 참고하여 시행하였다(http://www.kfda.go.kr/korea/endocrine/reference/education_fr.html).

[0062]

거세를 시행하고 10일 동안 안정화를 시켜 수술부위의 상처를 아물게 하였다. 이후 거세된 래트 (castrated rat)에 testosterone propionate(TP)를 투여하여 실험을 개시하였다. 개시 시점의 래트의 몸무게는 250-300 g 범위에 있었으며, 4마리를 한 군으로 하여 총 7그룹으로 나누어 전립선비대 유도 이후의 시료 경구투여에 맞도록 군을 나누었다. 실험동물은 사육상자 당 2마리 이하로 수용되었으며, 다른 군끼리 한 사육상자에 있지 않도록 배려하여 배치하였다. 각 그룹 중 Vehicle인 control group으로 사용될 4마리를 제외하고 나머지 실험동물은 전립선비대 유도를 위하여 testosterone propionate(TP, F0675, Tokyo Chemical Industry, Japan)을 3 mg/kg body weight/day로 주사(injection) 하였다. 실험의 오차를 최소화하기 위하여 3일마다 측정된 실험동물의 무게를 기준으로 총 주사 용량 (injection volume)은 100 μl가 되도록 옥수수 오일(corn oil)에 녹여 사용하였다.

[0063]

대조군(Control group)은 TP없이 corn oil(Sigma aldrich, USA)만을 100 μl씩 주사(injection) 하여 비히클(vehicle)로 사용하도록 준비하였다. 물과 사료는 자유섭취토록 하였으며 4주 동안 시행하였다. 각 군은 표 1과

같다. 실험에 있어서 TP는 실험동물의 무게에 따라 조절하여 투여되었으나 총 부피(volume)가 100 μ l를 넘지 않도록 하고, 주사(injection) 부위에 염증이 생기지 않도록 주의하여 투여하였다. 호르몬과 시료의 투여 오차를 줄이기 위하여 실험동물의 무게는 3일마다 측정하고 각 개체에 맞는 농도를 3일마다 계산하여 투여하였다.

표 1

Group composition of experimental rats

group	Testosterone Propionate	비고
Control(거세군)	corn oil 투여	생리식염수 투여
BPH(전립선비대)	3 mg/kg BW/day	생리식염수 투여
BPH+CL-HW 50 (전립선비대-울금열수추출물 50)	3 mg/kg BW/day	울금 열수추출물 50mg/kg BW/day
BPH+CL-HW 100 (전립선비대-울금열수추출물 100)	3 mg/kg BW/day	울금 열수추출물 100mg/kg BW/day
BPH+CL-EtOH 50 (전립선비대-울금20% 주정 50)	3 mg/kg BW/day	울금 20% 주정추출물 50mg/kg BW/day
BPH+CL-EtOH 100 (전립선비대-울금20% 주정 100)	3 mg/kg BW/day	울금 20% 주정추출물 100mg/kg BW/day
BPH+Finasteride	3 mg/kg BW/day	Finasteride 10mg/kg BW/day

2-2. 전립선비대유도 래트에서의 전립선무게의 변화

모든 실험동물을 CO₂ gas로 마취하고 희생시킨 후 혈액을 수집하고 전립선을 적출하여 무게를 측정하였다. 전립선은 적출하여 pH7.4 인산완충액에 1회 세척한 후 물기를 가볍게 제거하여 무게를 측정하고 기록하였다. 전립선의 무게는 실험동물의 100 g 체중(body weight)에 대한 mg으로 계산하여 표기하였다.

상기 실험의 결과, 전립선비대유도군에 비하여 울금 열수 및 20% 주정추출물 투여군의 전립선크기가 감소하였다 (표 2).

표 2

Effects on prostate weight in control and BPH induced rats.

Groups	Prostate weight(mg)	Prostate weight ratio (mg/100g of BW)
Control	0.028	0.01
BPH	1.037	0.31
BPH+CL-HW 50	1.435	0.41
BPH+CL-HW 100	0.676	0.19
BPH+CL-EtOH 50	1.007	0.32
BPH+CL-EtOH 100	1.249	0.34
BPH+Finasteride	0.735	0.20

2-3. 혈액에서의 DHT 억제

희생된 래트의 혈액은 심장채혈로 채취되었으며, 실온에서 30분 동안 정치한 후 3,000rpm에서 원심분리(MF-80, Hanil, 인천, 대한민국)하였다. 분리된 혈장에서의 testosterone의 측정은 ELASA assay kit(Bio Vendor, Bruno, Czecho)로 측정되었으며 측정값은 testosterone standard로 측정된 그래프를 이용하여 계산하였으며 단위는 pg/mL로 표기하였다. 혈장에서의 DHT는 ELASA assay로 측정되었다. 혈장 50 μ l을 goat-anti-rabbit antibody가 미리 coated된 96well microplate에 HRP- conjugated DHT와 DHT-specific antibody와 함께 1시간동안 실온에서 shaking incubation을 실시하였다. Incubation 후 기질용액을 첨가하고 15분 후 황산용액으로 반응을 멈춘 후 450 nm에서 10분이내에 시료별 차이를 측정하였다. 측정값의 계산은 DHT 기준액으로 그린 standard 그래프를 이용하였으며 BPH군에 대한 백분율(%)로 표기하였다.

상기 실험의 결과, 전립선비대유도 래트의 혈장으로부터 DHT level을 측정한 결과, 울금의 열수추출물(BPH+CL-HW)과 20% 주정추출물(BPH+CL-EtOH) 투여군에서 모두 양성대조군인 Finasteride 투여군과 상응하는 억제효과를

나타내었다(도 4).

[0072]

2-4. 전립선 조직에서 5-alpha reductase II 억제

[0073]

전립선비대를 유도한 래트에서 억제효과를 측정하기 위해 적출한 전립선 무게의 8배의 완충용액(PBS pH 7.4, 10mM)을 첨가한 후 4℃를 유지하는 환경에서 Ultra-Turrax(T10 basic, IKA, Germany)로 1분간 균질화하였다. 균질액은 4℃에서 5,000rpm으로 5분간 원심분리(Biofuge stratos, Kendro Laboratory Products, Germany) 하여 상등액을 취하여 효소원으로 사용하였다. 5-alpha reductase II의 저해능을 측정하기 위해서 ELISA assay kit(Cusabio, Germany)를 이용하였으며, 460nm에서 측정하고 측정값의 계산은 기준액으로 그린 standard 그래프를 이용하여 구하고 BPH군에 대한 백분율(%)로 표기하였다.

[0074]

상기 실험의 결과, 전립선비대유도 래트의 전립선조직에서 5-alpha reductase II 활성(SRD5A2의 활성)을 측정한 결과, BPH군의 효소활성을 100%로 표기할 때, 올금의 열수추출물(BPH+CL-HW) 100에서는 26.4% 억제, 올금 20% 주정추출물(BPH+CL-EtOH) 50 투여군에서 36.2%, 100에서는 13.7%의 억제율을 보였으며, 이는 모두 양성대조군인 Finasteride 투여군(39.7%억제)과 상응하는 억제효과였다 (도 5).

[0075]

실험예 3. 급성독성실험

[0076]

6 주령의 특정병원체부재 (Specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 각 그룹당 2마리씩의 동물에 본 발명의 올금 추출물을 100 mg/kg의 용량으로 1회 경구투여 하였다. 실험 물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 강장기와 흉강 장기의 이상여부를 관찰하였다.

[0077]

본 실험 수행 결과, 실험 물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 본 발명의 추출물은 랫트에서 각각 100 mg/kg 까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량 (LD₅₀)은 100 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

[0078]

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

[0079]

제제예 1. 산제의 제조

[0080]

CW 추출물 ----- 20 mg

[0081]

유당 ----- 100 mg

[0082]

탈크 ----- 10 mg

[0083]

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0084]

제제예 2. 정제의 제조

[0085]

HW 추출물 ----- 10 mg

[0086]

옥수수전분 ----- 100 mg

[0087]

유당 ----- 100 mg

[0088]

스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg

[0089]

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

- [0090] **제제예 3. 캡슐제의 제조**
- [0091] 20% EtOH 추출물 ----- 10 mg
- [0092] 결정성 셀룰로오스 ----- 3 mg
- [0093] 락토오스 ----- 14.8 mg
- [0094] 마그네슘 스테아레이트 ----- 0.2 mg
- [0095] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

- [0096] **제제예 4. 주사제의 제조**
- [0097] 80% EtOH 추출물 ----- 10 mg
- [0098] 만니톨 ----- 180 mg
- [0099] 주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg
- [0100] Na₂HPO₄·12H₂O ----- 26 mg
- [0101] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

- [0102] **제제예 5. 액제의 제조**
- [0103] CW 추출물 ----- 20 mg
- [0104] 이성화당 ----- 10 g
- [0105] 만니톨 ----- 5 g
- [0106] 정제수 ----- 적량
- [0107] 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 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

- [0108] **제제예 6. 건강 식품의 제조**
- [0109] 20% EtOH 추출물 ----- 1000 mg
- [0110] 비타민 혼합물 ----- 적량
- [0111] 비타민 A 아세테이트 ----- 70 μg
- [0112] 비타민 E ----- 1.0 mg
- [0113] 비타민 B₁ ----- 0.13 mg
- [0114] 비타민 B₂ ----- 0.15 mg
- [0115] 비타민 B₆ ----- 0.5 mg
- [0116] 비타민 B₁₂ ----- 0.2 μg
- [0117] 비타민 C ----- 10 mg
- [0118] 비오틴 ----- 10 μg
- [0119] 니코틴산아미드 ----- 1.7 mg

[0120]	엽산 -----	50 μ g
[0121]	판토텐산 칼슘 -----	0.5 mg
[0122]	무기질 혼합물 -----	적량
[0123]	황산제1철 -----	1.75 mg
[0124]	산화아연 -----	0.82 mg
[0125]	탄산마그네슘 -----	25.3 mg
[0126]	제1인산칼륨 -----	15 mg
[0127]	제2인산칼슘 -----	55 mg
[0128]	구연산칼륨 -----	90 mg
[0129]	탄산칼슘 -----	100 mg
[0130]	염화마그네슘 -----	24.8 mg

[0131] 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.

[0132] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

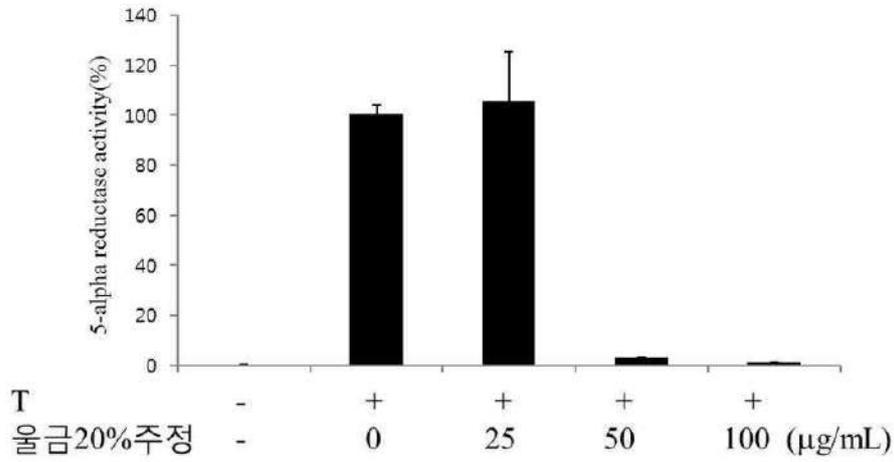
[0133]	HW 추출물 -----	100 mg
[0134]	비타민 C -----	15 g
[0135]	비타민 E(분말) -----	100 g
[0136]	젖산철 -----	19.75 g
[0137]	산화아연 -----	3.5 g
[0138]	니코틴산아미드 -----	3.5 g
[0139]	비타민 A -----	0.2 g
[0140]	비타민 B ₁ -----	0.25 g
[0141]	비타민 B ₂ -----	0.3 g
[0142]	물 -----	정량

[0143] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 °C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0144] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

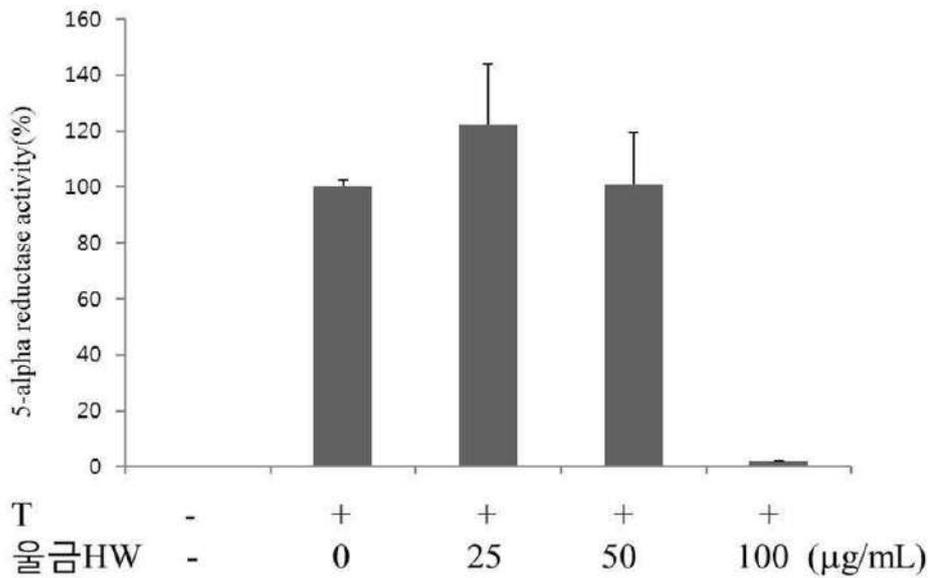
도면

도면1



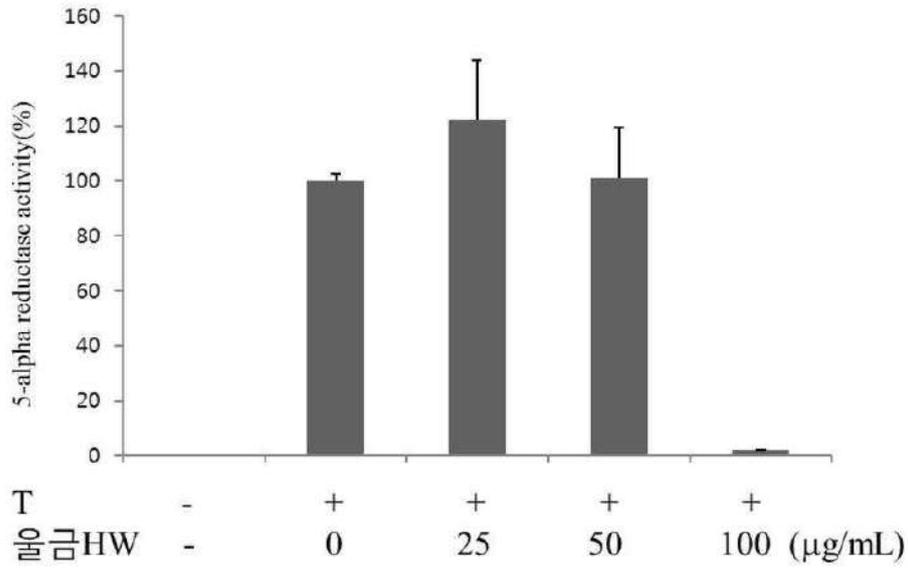
5-alpha reductase activity of *Curcuma aromatica* SALISB in rat prostate homogenate. Data are expressed as mean \pm S.D.

도면2



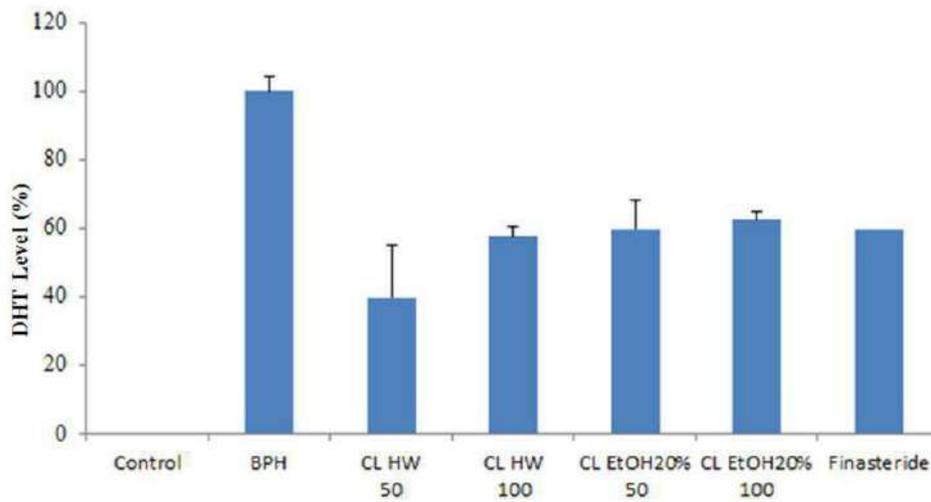
5-alpha reductase activity of hot water *Curcuma aromatica* SALISB extract in rat prostate homogenate. Data are expressed as mean \pm S.D.

도면3



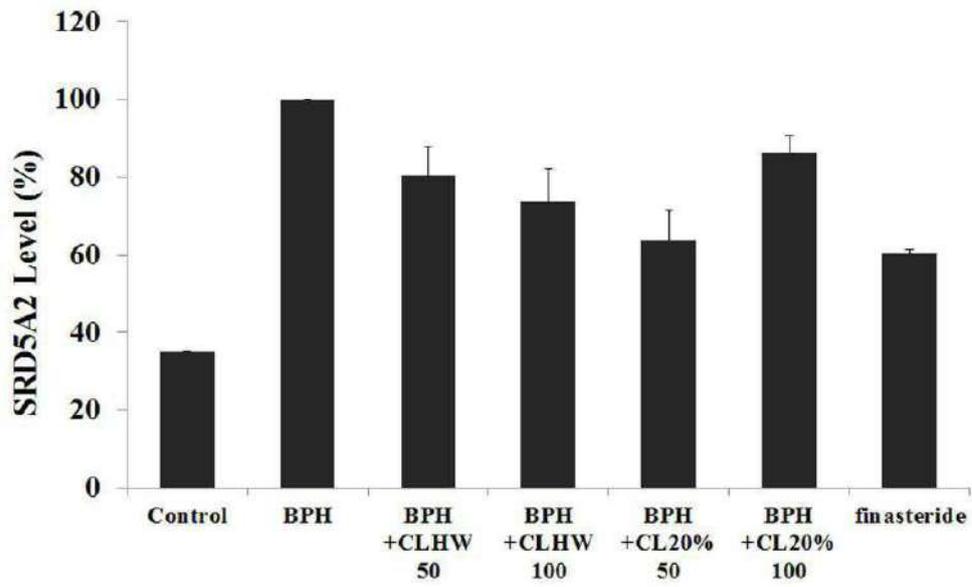
5-alpha reductase activity of 20% Ethanol *Curcuma aromatica* SALISB extract in rat prostate homogenate.

도면4



Effects of oral administration of *Curcuma aromatica* SALISB on DHT in Prostate Homogenate of BPH induced rats.

도면5



Effects of oral administration of *Curcuma aromatica* SALISB on SRD5A2 level in Prostate Homogenate of BPH induced rats.