



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년11월05일

(11) 등록번호 10-1566441

(24) 등록일자 2015년10월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/9066 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01) *A61K 31/16* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-0075914(분할)
- (22) 출원일자 2011년07월29일
 심사청구일자 2014년09월03일
- (65) 공개번호 10-2011-0093975
- (43) 공개일자 2011년08월19일
- (62) 원출원 특허 10-2009-0085112
 원출원일자 2009년09월09일
 심사청구일자 2009년09월09일
- (30) 우선권주장
 1020090062321 2009년07월08일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2008280333 A
 “신종 인플루엔자(돼지독감) 감염 예방과 자연치
 료”(인터넷자료, 2009.05.06)
 Agric. Food chem. 50(13) pp.3668-3672 (2002)
- (73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자
 이우송
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 노문철
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인필앤은지

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 조현경

(54) 발명의 명칭 **울금 추출물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물 및 뉴라미니테
 이즈 활성의 억제용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 울금(Turmeric) 추출물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물 및 뉴라미니테
 이즈 활성의 억제용 조성물에 관한 것으로, 울금 추출물, 분획물 및 이로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물이
 뉴라미니테이즈의 활성을 억제하는 효과를 나타내고, 다양한 인플루엔자 바이러스에 대해 살바이러스 및 세포변
 성억제효과를 동시에 나타내므로 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

(72) 발명자

박수진

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

류영배

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

장종선

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

정형재

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

권형준

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 308025-05-1-CG000

부처명 농림기술관리센터

연구관리전문기관 농림수산식품부

연구사업명 기획(지정공모)과제

연구과제명 조류인플루엔자 예방용 사료 첨가제 및 식·의약 생물소재개발 (Development of bioactive material for the preventive feed additive and treatment of avian influenza)

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2008.12.20 ~ 2013.12.19

명세서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 바이러스 뉴라미니데이즈 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, H1N1 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 있어서,

상기 뉴라미니데이즈 활성 억제제는 울금 또는 강황 추출물 또는 이의 분획물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 분획물은 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 또는 물 분획물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 H1N1 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴, 또는 돼지독감인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6

인플루엔자 바이러스 뉴라미니데이즈 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, H1N1 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 있어서,

상기 뉴라미니데이즈 활성 억제제는 울금 또는 강황 추출물 또는 이의 분획물인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 드링크제, 사료, 알콜 음료 및 비타민 복합제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

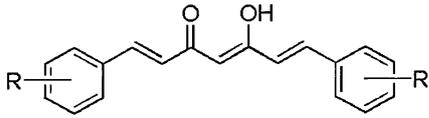
삭제

청구항 10

인플루엔자 바이러스 뉴라미니데이즈 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, H1N1 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 있어서,

상기 뉴라미니데이즈 활성 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

[화학식 1]

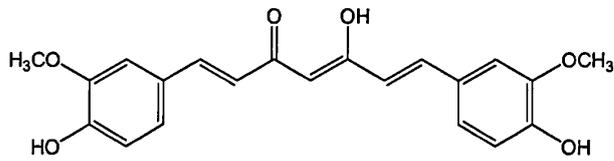


상기 식에서, R은 독립적으로 각각 수소, 히드록시기, 또는 C₁~C₁₀의 알콕시기이다.

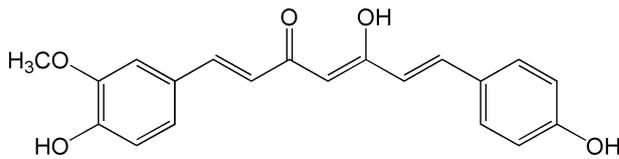
청구항 11

제10항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 화학식 4 중 어느 하나로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

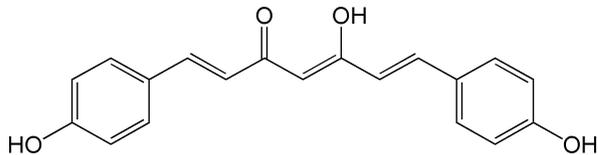
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



청구항 12

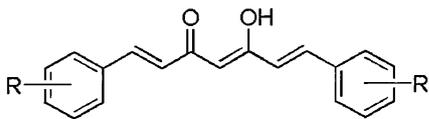
삭제

청구항 13

인플루엔자 바이러스 뉴라미니다제 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는, H1N1 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 있어서,

상기 뉴라미니다제 활성 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

[화학식 1]

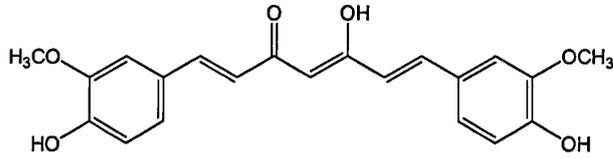


상기 식에서, R은 독립적으로 각각 수소, 히드록시기, 또는 C₁~C₁₀의 알콕시기이다.

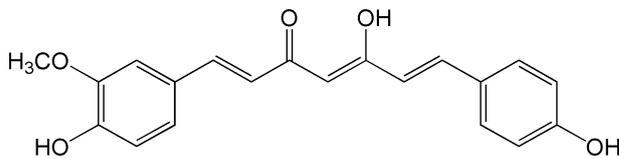
청구항 14

제13항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 화학식 4 중 어느 하나로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

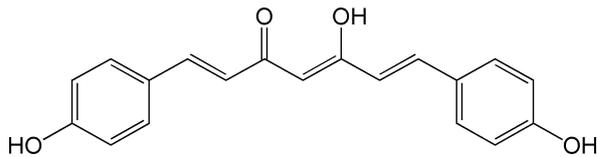
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



청구항 15

제13항에 있어서, 상기 식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 드링크제, 사료, 알콜 음료 및 비타민 복합제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 울금 추출물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물 및 뉴라미니데이즈 활성의 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인플루엔자 바이러스는 급성 호흡기 질환을 일으키는 전염성이 매우 강한 바이러스로 온 세계에 집단감염이나 대 유행을 야기하여 소아, 고령자, 심폐질환 환자에게 심각한 호흡기 증상을 유발하는 바이러스중 하나이다 (Hien, T. T. et al. *N. Eng. J. Med.*, 350, 1179, 2004). 인플루엔자 바이러스는 분류학적으로 오르토믹소바

이러스(*Orthomyxovirus*)에 속하며 A, B, C의 3가지 형이 있으며 특히 유행적으로 확산되는 형은 A, B형이다. 이들 바이러스 표면에는 당단백질인 적혈구 응집소(hamagglutinin, HA)와 뉴라미니데이즈(neuraminidase, NA)라는 두 종류의 표면 항원이 존재하고 내부에는 8개의 분절되어진 RNA가 존재한다. 헤마글루티닌(hamagglutinin)은 머리와 줄기로 구성되어져 있는 트라이머(trimer) 형태이고, 이중 머리 부분은 대부분의 항원변이와 관련되어 있으며 숙주세포의 표면에 있는 말단 시알산 잔기와 결합하여 바이러스를 부착시키고 순차적으로 바이러스가 숙주세포로 침투가 가능하게 한다(Chandrasekaran, A. et al. *Nature biotechnology* 26, 107, 2008). 뉴라미니데이즈(neuraminidase)는 머리와 줄기형태를 가지는 버섯모양의 테트라머(tetramer)로 머리상단 표면에 활성자리가 있으며 감염된 세포내에서 복제 및 증식된 바이러스가 세포표면의 올리고사카라이드 부분과 말단 뉴라민산(neuraminic acid) 잔기를 연결해주는 알파-케토사이드 본드(ketosidic bond)를 절단하여 바이러스를 숙주세포 밖으로 배출하여 호흡기 점막세포로 침투하는데 중요한 역할을 한다(a. Mark, V. I. *Nature review* 6, 967, 2007. b. Huberman, K. et al. *Virology* 214, 294, 1995).

[0003]

바이러스의 표면항원들은 동일한 아형에서 변이를 일으키고, 매년 새로운 항원 변이주가 출현한다. 특히 인플루엔자 바이러스 중 최근까지 문제가 되고 있는 조류 인플루엔자 바이러스는 대변이가 일어나 닭, 칠면조, 오리 및 야생조류 등 여러 종류의 조류를 감염시키며 빠른 전파로 인해 닭이 감염되면 80% 이상이 폐사함으로써 전 세계적으로 양계산업에 가장 큰 피해와 위협을 주는 바이러스 질환이며, 그 파급효과는 양계산업에만 한정되어 있지 않고 인체에 대한 감염으로 인하여 사람에게 질병을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Gubareva, L. V. et al. *Lancet*. 355, 2000). 현재까지 이러한 인플루엔자 바이러스가 사람에게 질환을 일으킨 경우를 구체적으로 살펴보면, 20세기 세 차례의 독감대유행, 즉 스페인독감(H1N1)으로 약 3천만 명, 아시아독감(H2N2)으로 약 백만 명, 홍콩독감(H3N2)으로 백만 명 정도가 사망한 것으로 보고되고 있다. 21세기에 접어들어 2003년부터 2008년까지는 385명이 감염되어 243명이 사망에 이르렀고, 최근 2009년 4월에 발생한 신종플루는 이미 WHO에서 공식적으로 팬데믹을 선포하였고, 6월 29일 현재 115국가에서 70,893명(사망자 311명 포함)이 발생하였고, 우리나라에서도 멕시코 자원봉사를 다녀온 수녀가 2009년 5월 2일 첫 확진환자로 판명되었으며, 8월 16일 현재 확진된 누적 환자 수는 2,089명(사망자 2명 포함)으로 보고되고 있다.

[0004]

이러한 바이러스의 감염을 예방하고 치료하기 위한 방법으로 상피세포로의 흡착 저해, 세포로의 침입 저해, 유전자의 전사 및 복제의 저해, 단백질 합성의 저해, 세포로부터 방출의 억제 등을 생각할 수 있으며, 이들 각각은 항 바이러스의 표적이 되고 있다.

[0005]

종래부터 인플루엔자 바이러스에 의해 야기되는 질환을 치료하기 위해서 아만타딘(Amatadine), 리만타딘(Rimatadine), 자나미비르(Zanamivir), 오셀타미비르(Osetamivir) 등 4가지 물질이 미국식품의약품 안전청(FDA)으로부터 승인받아 사용되고 있다. 그러나 바이러스 증식에 필수적인 세포막 단백질인 M2 단백질의 이온채널을 차단하여 바이러스의 탈외피(uncoating)를 방해함으로써 항바이러스 작용을 하는 M2 억제제인 아만타딘(Amatadine), 리만타딘(Rimatadine)은 인플루엔자 바이러스 A형에만 효과가 있으며 40년 동안 사용되는 동안 내성을 가진 바이러스가 발생되고 신경계 및 위장에 심각한 부작용이 나타나는 것으로 보고되고 있다(Bantia, S. et al. *Antiviral Research* 69, 39, 2006). 1999년 이후에는 바이러스의 증식에 중요한 역할을 하고 내성 발생빈도가 적으며, A형 및 B형 인플루엔자 바이러스 모두에 안정적으로 존재하는 뉴라미니데이즈의 저해제인 자나미비르(Zanamivir), 오셀타미비르(Osetamivir)와 같은 신약에 의한 바이러스 감염 치료에 대한 보고되고 있다(Zhang, J. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3009, 2006).

[0006]

그러나 자나미비르의 경우에는 높은 항바이러스 효과를 가지고 있지만 낮은 생체이용률과 빠른 신장에서의 배출의 단점(Ryan, D. M. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 2583, 1995)을 가지고 있으며, 오셀타미르는 심각한 구토증세가 나타나는 부작용이 있다.

[0007]

현재까지 개발된 항바이러스들은 심한 부작용을 나타내고 있으며 그 응용에 대한 많은 주의가 필요하다. 또한 백신의 개발은 유행하는 바이러스의 형과 백신의 바이러스가 맞지 않으면 효과가 낮은 문제점이 있기 때문에 감염 억제 효과가 뛰어나고 안정성이 우수한 새로운 인플루엔자 바이러스제의 개발의 필요성이 증가하고 있다.

[0008]

이에, 본 발명자들은 울금 추출물 및 분획물 또는 이로부터 분리한 커큐미노이드계 화합물들이 뉴라미니데이즈에 대한 억제활성, 바이러스에 대한 살바이러스 억제효과 및 세포변성 억제효과를 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

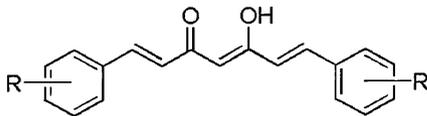
해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물 및 이를 이용한 치료방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선을 위한 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선을 위한 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 다양한 생물 중에 존재하는 뉴라미니데이즈의 활성을 억제하여 그와 관계되는 질환의 치료에 이용할 수 있는 뉴라미니데이즈 활성의 억제용 조성물 및 이를 이용한 억제방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 양상으로서, 울금 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물이 제공된다.
- [0014] 본 발명의 다른 양상에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물이 제공된다.

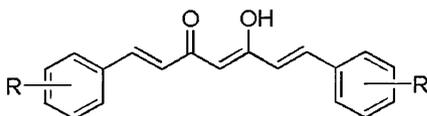
[0015] [화학식 1]



- [0016]
- [0017] 상기 식에서, R은 독립적으로 각각 수소, 히드록시기, 또는 C₁-C₁₀의 알콕시기이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 양상에 따르면, 울금 추출물, 울금 분획물 또는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물을 인플루엔자 바이러스 감염의 발병 또는 발병가능성이 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 치료방법이 제공된다.

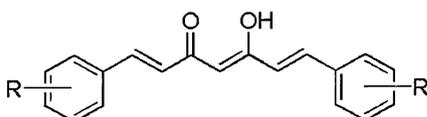
[0019] [화학식 1]



- [0020]
- [0021] 상기 식에서, R은 독립적으로 각각 수소, 히드록시기, 또는 C₁-C₁₀의 알콕시기이다.

[0022] 본 발명의 또 다른 양상에 따르면, 울금 추출물, 울금 분획물 또는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 뉴라미니데이즈 활성의 억제용 조성물이 제공된다.

[0023] [화학식 1]



- [0024]
- [0025] 상기 식에서, R은 독립적으로 각각 수소, 히드록시기, 또는 C₁-C₁₀의 알콕시기이다.

[0026] 본 발명의 또 다른 양상에 따르면, 상기 조성물을 뉴라미니데이즈를 포함하는 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 뉴라미니데이즈의 활성을 억제하는 방법이 제공된다.

- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은 울금 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 조성물은 인플루엔자 바이러스 표면에 존재하면서 바이러스 복제에 필수적인 기능을 하는 뉴라미니테이즈의 활성을 억제함으로써 인플루엔자 바이러스가 호흡기관 내 다른 세포로 확산되는 것을 차단하기 때문에 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0031] 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0032] 상기 인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스, C형 인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 바람직하게는 H1N1 인플루엔자 바이러스 또는 H9N2 인플루엔자 바이러스일 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스는 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴을 일으킬 수 있으며, 특히 조류독감, 돼지독감 또는 염소독감을 야기시킬 수 있다.
- [0033] 일반적으로 울금이란 가을울금 (*Curcuma longa* Linne)의 덩이뿌리를 그대로 또는 주피를 제거하고 찌서 말린 뿌리를 의미 (대한약전 제9개정)하고, "덩이뿌리"란 덩이 모양으로 생긴 뿌리로서, 괴근(塊根)이라고도 한다.
- [0034] 본 발명에서 울금(Turmeric)이란 커큐마속(*Curcuma* sp.)에 속하는 식물의 덩이뿌리 부분을 의미하는 것으로, 상기 커큐마속(*Curcuma* sp.)에 속하는 식물에는 온울금(*Curcuma wenyujin*, Y. H. Chen et C. Ling), 가을울금(황울금)(*Curcuma longa* Linne), 봄울금(*Curcuma longa* Salisb.), 보라색울금(*Curcuma zedoaria*), 광서아출(계울금)(*Curcuma kwansiensis*, S. G. Lee et C. F. Liang), 아출(녹사울금) (*Curcuma aeruginosa*), 봉아출 [*Curcuma phaeocaulis* Val. (생강과 Zingiberaceae)] 또는 커큐마 도메스티카 (*Curcuma domestica*) 등이 있으며, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 한편, 가을울금(*Curcuma longa* Linne)의 뿌리줄기 부분을 일반적으로 강황 (*Curcuma longa Rhizoma*)이라 하며 (대한약전 제9개정), "뿌리줄기"란 식물의 줄기가 뿌리처럼 땅속으로 뻗어서 자라나는 땅속줄기로서, 근경(根莖)이라고도 한다.
- [0036] 커큐마속(*Curcuma* sp.)에 속하는 식물의 경우 "덩이뿌리" 부위와 "뿌리줄기" 부위를 가지는데, "덩이뿌리" 부위에는 커큐민, 데메톡시커큐민 및 비스데메톡시커큐민이 주요성분으로 함유되어 있다.
- [0037] 구체적으로, 커큐마속(*Curcuma* sp.)에 속하는 식물 중 가을울금(*Curcuma longa* Linne)의 부위에 따른 커큐민 유도체의 함량을 측정한 결과, 덩이뿌리에 커큐민은 17.0 g/kg 에탄올 추출물로 함유되어 있고, 데메톡시커큐민 및 비스데메톡시커큐민은 각각 5.3 및 3.4 g/kg 에탄올 추출물로 함유되어 있다. 한편, 줄기 부위에는 상기 화합물들이 검출되지 않았고, 뿌리줄기 부위에는 커큐민, 데메톡시커큐민, 및 비스데메톡시커큐민이 각각 2.8, 0.4, 및 6.8 g/kg 에탄올 추출물로 함유되어 있었다(실시예 4).
- [0038] 본 발명에서 울금은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.
- [0039] 상기 울금 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 여과법 및 환류추출법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있다. 바람직하게는 세척 및 건조로 이물질이 제거된 울금의 뿌리를 분쇄하여 얻은 울금 건조물을 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 C₁-C₄의 알코올로 추출한 추출물일 수 있고, 가장 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올로 추출한 추출물일 수 있다. 이때, 추출용매는 울금의 건조중량의 2 ~ 20 배로 하는 것이 바람직하다. 일례로 울금 건조물을 세절한 후 추출용기에 넣고 C₁-C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올을 넣고 일정기간 상온에서 방치한 다음, 여과하여 알코올 추출물을 얻을 수 있다. 이때, 추출은 상온에서 1주 동안 방치하는 것이 바람직하며, 이후에 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 거칠 수 있다.

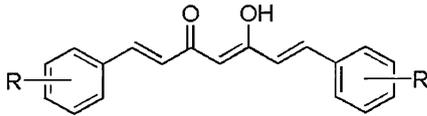
[0040]

한편, 본 발명에서 울금 분획물은 상기 울금 추출물로부터 분획하여 얻을 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 울금 분획물은 울금 추출물을 물에 현탁시킨 후 헥산 및 에틸아세테이트로 각각 분획함으로써 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물로서 각각 얻을 수 있다.

[0041]

더 나아가, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

화학식 1



[0042]

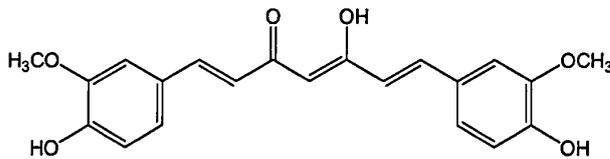
[0043]

상기 식에서, R은 독립적으로 각각 수소, 히드록시기, 또는 C₁-C₁₀의 알콕시기이다.

[0044]

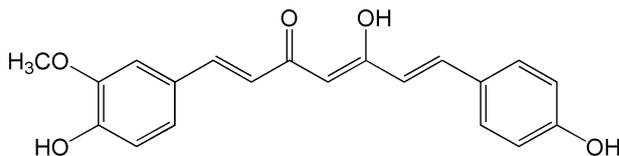
이 때, 상기 화학식 1의 화합물은 울금 추출물 또는 울금 분획물로부터 분리된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 화학식 4 중 어느 하나로 표시되는 화합물일 수 있다.

화학식 2



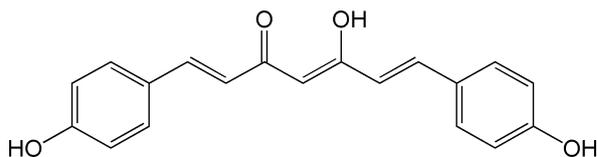
[0045]

화학식 3



[0046]

화학식 4



[0047]

[0048]

본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 울금에 존재하는 대표적인 활성성분으로, 상기 화합물을 분리하기 위한 방법은 하기와 같이 수행될 수 있다.

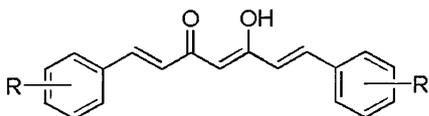
- [0049] 먼저, 울금을 물, C₁~C₄의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 울금 추출물을 얻는다(단계 1). 상기 울금은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있으며, 깨끗이 세척하고 건조하여 사용한다. 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급 알코올을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올을 사용할 수 있다.
- [0050] 상기 단계 1에 있어서, 상기 울금 추출물을 얻는 단계는 건조된 울금을 음건 세절한 다음 추출 효율을 높이기 위하여 분말상태로 만든 후 추출용기에 넣고 적당한 양의 알코올을 첨가하고, 이를 상온에서 5일 동안 방치한 후 거름종이 등으로 여과하여 수행될 수 있다. 이러한 추출 과정은 수회 반복될 수 있으며, 이후에 농축 또는 동결건조 등의 방법이 추가적으로 수행될 수 있다.
- [0051] 이어서, 상기 단계 1에서 얻은 울금 추출물에 물을 가하여 현탁시키고, 헥산 및 에틸아세테이트를 사용하여 순차적으로 분획하여 울금 분획물을 얻는다(단계 2). 이때, 통상의 분별 추출 방법을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 분별 깔대기를 사용할 수 있다. 상기 울금 분획물은 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물로 얻을 수 있다.
- [0052] 그 후, 상기 단계 2에서 얻은 울금 분획물을 실리카겔 크로마토그래피로 화합물을 분리하고 정제하여 상기 화학식 1의 화합물을 얻을 수 있다(단계 3). 상기 화합물 분리를 위한 실리카겔 크로마토그래피를 수행하는 경우, 이동상으로는 *n*-헥산, *n*-헥산 에틸아세테이트, 클로로포름·아세톤 혼합용매 및 메탄올을 사용하는 것이 바람직하고, 추가되는 크로마토그래피에서는 *n*-헥산·아세톤 혼합용매를 사용할 수 있다. 이때 사용되는 *n*-헥산·에틸아세테이트 혼합용매의 부피비는 50:1 ~ 1:5 부피비가 바람직하며, 클로로포름·아세톤 혼합용매일 경우에는 150:1 ~ 1:4 부피비가 바람직하다. 상기 크로마토그래피는 단일 화합물이 정제될 때까지 1회 내지 수회에 걸쳐 수행할 수 있으며, 필요에 따라 농축, 재결정을 실시할 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.
- [0054] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.
- [0055] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염의 형태로 만들어 사용할 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

- [0056] 한편, 본 발명의 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0057] 상기 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물인 경우 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 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. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0058] 상기 약제학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0059] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0060] 본 발명에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 울금 추출물 또는 그 분획물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋으며, 화학식 1의 화합물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0062] 한편, 본 발명은 상기 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 인플루엔자 바이러스 감염의 발병 또는 발병가능성이 있는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 치료방법을 제공한다. 상기 인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스, C형 인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 바람직하게는 H1N1 인플루엔자 바이러스 또는 H9N2 인플루엔자 바이러스일 수 있다. 또한, 상기 인플루엔자 바이러스 감염 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴일 수 있으며, 특히 조류독감, 돼지독감 또는 염소독감일 수 있다.
- [0063] 본 발명에서 용어, "개체"란 인플루엔자바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고 본 발명의 추출물, 분획물 또는 화합물을 포함하는 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물로 다양한 인플루엔자바이러스 아형 또는 변이형의 인간 인플루엔자바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물로 다양한 인플루엔자바이러스 아형 또는 변이형의 조류 인플루엔자바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 다양한 인플루엔자바이러스 아형 또는 변이형의 조류 인플루엔자바이러스로 감염된 닭 또는 돼지를 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물을 기존의 인플루엔자바이러스 감염 질환의 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.
- [0064] 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0065] 아울러, 본 발명은 울금 추출물, 울금 분획물 또는 이로부터 분리한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0066] [화학식 1]

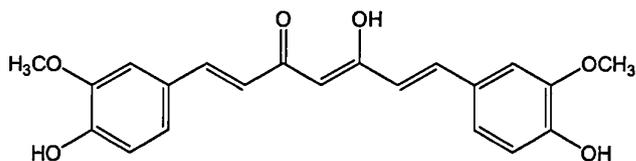


[0067]

[0068] 상기 식에서, R은 독립적으로 각각 수소, 히드록시기, 또는 C₁~C₁₀의 알콕시기이다.

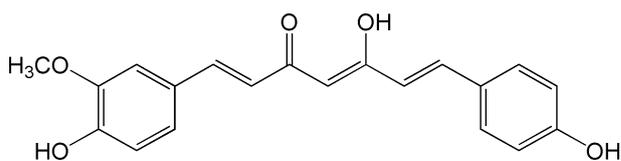
[0069] 이 때, 상기 화학식 1의 화합물은 울금 추출물 또는 울금 분획물로부터 분리된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 화학식 4 중 어느 하나로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0070] [화학식 2]



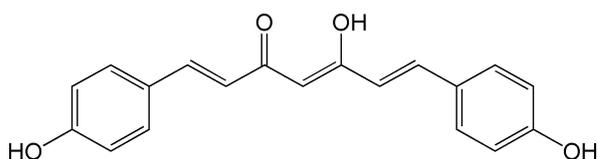
[0071]

[0072] [화학식 3]



[0073]

[0074] [화학식 4]



[0075]

[0076] 즉, 본 발명의 울금 추출물, 울금 분획물 또는 이로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 조성물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 울금 추출물, 분획물 또는 그로부터 분리된 화학식 1로 표시되는 화합물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물, 분획물 또는 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용

될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 울금 추출물, 울금 분획물 또는 이로부터 분리한 화학식 1로 표시되는 화합물은 원료 조성물 중 0.01 ~ 10 중량%, 바람직하게는 0.05 ~ 1중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

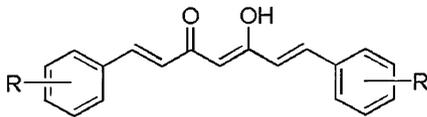
[0077] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0078] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0079] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 과육의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 10 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 이들 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0080] 아울러, 본 발명은 울금 추출물, 울금 분획물 또는 이로부터 분리한 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

[0081] [화학식 1]

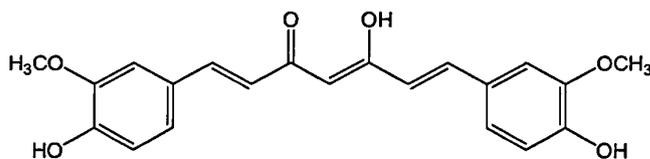


[0082]

[0083] 상기 식에서, R은 독립적으로 각각 수소, 히드록시기, 또는 C₁~C₁₀의 알콕시기이다.

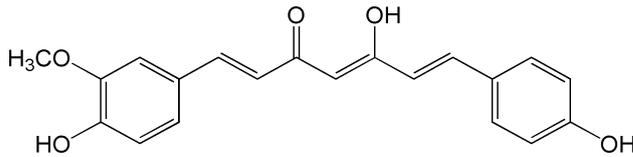
[0084] 이 때, 상기 화학식 1의 화합물은 울금 추출물 또는 울금 분획물로부터 분리된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 화학식 4 중 어느 하나로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0085] [화학식 2]



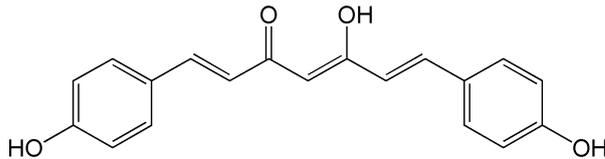
[0086]

[0087] [화학식 3]



[0088]

[0089] [화학식 4]



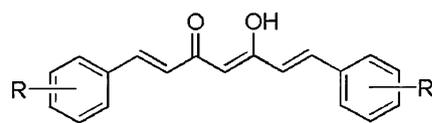
[0090]

[0091] 즉, 본 발명의 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 목적으로 의약품 조성물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 울금 추출물, 분획물 또는 그로부터 분리된 화학식 1로 표시되는 화합물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물, 분획물 또는 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0092] 바람직하게는, 상기 의약품 조성물은 소독정결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제의 제조에 사용될 수 있다.

[0093] 또한, 본 발명은 울금 추출물, 울금 분획물 또는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 뉴라미니데이즈 활성의 억제용 조성물을 제공한다.

[0094] [화학식 1]



[0095]

[0096] 상기 식에서, R은 독립적으로 각각 수소, 히드록시기, 또는 C₁-C₁₀의 알콕시기이다.

[0097] 이 때, 상기 뉴라미니데이즈는 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스, C형 인플루엔자 바이러스, 클로스트리디움 퍼프린젠(*Clostridium perfringens*) 또는 인간에서 유래한 것일 수 있으며, 바람직하게는 H1N1 인플루엔자 바이러스 또는 H9N2 인플루엔자 바이러스에서 유래한 것일 수 있다.

[0098] 뉴라미니데이즈(neuraminidase: 시알리데이즈, 아실뉴라미닐 하이드롤레이즈 라고도 알려져 있음)는 동물과 몇몇 미생물에 존재하는 효소로, 뉴라미니데이즈를 함유하는 많은 미생물이 인간과 가금류, 말, 돼지, 및 바다표범을 비롯한 다른 동물에게 병을 일으킨다. 따라서, 뉴라미니데이즈 활성을 억제하는 본 발명의 조성물은 뉴라미니데이즈의 활성과 관련된 많은 질환들의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0099] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 뉴라미니데이즈를 포함하는 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 뉴라미니데이즈의 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 접촉은 통상적인 방법으로 이루어지고, 뉴라미니데이즈를 포함하는 시료는 살아있는 유기체, 조직 또는 세포 배양체, 생물학적 물질 시료(혈액, 혈청, 뇨, 뇌척수액, 눈물, 가래, 타액, 조직 시료 등) 등이 포함되며, 뉴라미니데이즈를 생성시키는 유기체, 대개 바이러스와 같은 병인성 유기체를 함유할 수 있다. 이러한 시료들은 물, 또는 유기 용매/물 혼합물 등을 포함하는 어떠한 배지 내에 담

길 수 있다.

- [0100] 또한, 본 발명의 조성물을 투여한 후에 뉴라미니데이즈의 활성은 뉴라미니데이즈 활성을 진단하는 직접 또는 간접 방법을 포함한 어떠한 방법에 의해서도 관찰될 수 있다. 뉴라미니데이즈 활성을 진단하는 정량적인, 정성적인 또는 세미-정량적인 방법들 모두가 사용가능하며, 살아있는 유기체의 생리화학적 특성을 관찰하는 등의 다른 어떠한 방법도 적용될 수 있다.

발명의 효과

- [0101] 본 발명에 따른 울금 추출물, 분획물 및 이로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물을 포함하는 조성물들은 뉴라미니데이즈의 활성을 억제하는 효과를 나타내고, 다양한 인플루엔자 바이러스에 대해 살바이러스 및 세포변성억제 효과를 동시에 나타내므로 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0102] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0103] 실시예 1: 울금 추출물의 제조

- [0104] 본 실시예에서 사용한 울금은 일반적으로 한약재상이나 시장에서 구입할 수 있는 것으로 가을울금(*Curcuma longa* Linne)의 덩이뿌리(Radix) 부위를 그대로 썬 것인 것을 구입한 후 본 발명의 추출물을 효율적으로 얻기 위하여 파우더 형태로 분쇄하여 사용하였다. 울금 1.6 kg에 100% 에탄올(EtOH) 7.5 l를 가하여 실온에서 5일 방치하고 여과지로 여과하고 농축하여 울금 에탄올 추출물(170 g)을 얻었다.

[0105] 실시예 2: 울금 추출물로부터 울금 분획물 및 커큐미노이드계 화합물의 분리 및 정제

- [0106] 상기 실시예 1에서 수득한 울금의 에탄올추출물 170 g에 물 1 l를 넣어 현탁시켰다. 이를 분별 깔대기에 넣고, *n*-헥산 및 에틸아세테이트를 순서대로 이용하여 분별 추출하여 *n*-헥산 가용추출물 (23 g), 에틸아세테이트 가용추출물 (85 g) 및 물 가용추출물 (34 g)을 수득하였다.

- [0107] 상기에서 수득한 에틸아세테이트 가용추출물 85 g을 클로로포름, 메탄올 및 이들의 혼합용매 (80:1 ~ 1:1)를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피[실리카겔 500 g, 70~230 메쉬(mesh)]를 수행하여 15개의 분획물(Fr.-1~15)로 분리하였다. 이중 여섯 번째 분획물(Fr.-6, 16 g)은 *n*-헥산 : 에틸아세테이트(20:1 ~ 1:1 (v/v))의 혼합용매를 이동상으로 하여 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (30 g, 230 ~ 400 메쉬)를 수행하여 5개의 분획물(Fr.-6-1~5)을 얻었다.

- [0108] 그 중 Fr.-6-2~3 분획물(11 g)에 대해 클로로포름, 메탄올 및 이들의 혼합용매 (80:1 ~ 4:1)를 이동상으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 획득한 분획물을 대상으로 제조용 TLC(preparative TLC)법으로 전개[*n*-헥산:에틸아세테이트=4:1 (v/v)]하여 순수한 화합물 1 (8 g)을 수득하였다. 또한, 여덟 번째 분획물 (Fr.-8, 14 g)은 *n*-헥산 : 에틸아세테이트(20:1 ~ 1:1 (v/v)) 및 클로로포름 : 메탄올 (80:1 ~ 20:1 (v/v))의 혼합용매를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (30 g, 230 ~ 400 메쉬)를 반복적으로 수행하여 화합물 2 (0.4 g)와 3 (0.2 g)을 수득하였다.

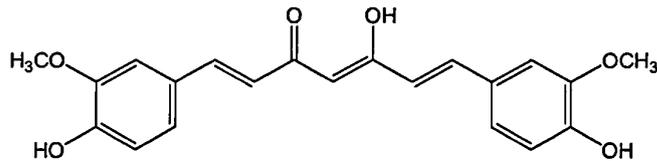
[0109] 실시예 3: 커큐미노이드계 화합물의 구조 분석

- [0110] 상기 실시예 2에서 얻은 커큐미노이드계 화합물의 분자량 및 분자식을 VG 고분해능 GC/MS 분광기(VG high resolution GC/MS spectrometer, Election Ionization MS, Autospec-Ultima)를 사용하여 결정하였다. 또한, 핵자기공명(NMR) 분석(Bruker AM 500)을 통하여 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 2D NMR 분광학 자료를 이용하여 분자구조를 결정하였다.

[0111] 이상의 기기분석결과를 발표된 문헌의 것과 비교 분석한 결과, 하기 화학식 2 내지 화학식 4로 표시되는 커큐민, 데메톡시커큐민 및 비스데메톡시커큐민으로 확인하였다(*Food Chem.* 265-272, 2009; *J. Nat. Prod.* 1227-1231, 2002; *J. Nat. Prod.* 1531-1534, 1998; *J. Agric. Food Chem.* 3668-3672, 2002)). 구체적인 분석 결과는 다음과 같다.

[0112] **화합물 1: 커큐민 (Curcumin)**

[0113] [화학식 2]



[0114]

[0115] 1) 물성 : 밝은 주황색 분말 (m.p. 183 °C)

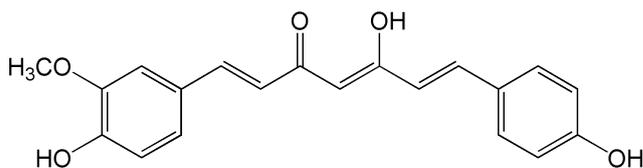
[0116] 2) 분자량 : 368.3

[0117] 3) 분자식 : C₂₁H₂₀O₆

[0118] 4) ¹H-NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz) δ 7.62 (2H, d, *J* = 15.80 Hz, H-4, H-4'), 7.35 (2H, d, *J* = 1.91 Hz, H-6, H-6'), 6.83 (2H, H-3, H-5), 7.20 (2H, dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, H-10, H-10'), 6.90 (2H, d, *J* = 8.15 Hz, H-9, H-6'), 5.99 (1H, s, H-1). ¹³C-NMR (acetone-*d*₆, 125 MHz) δ 56.72, 102.01, 111.95, 116.64, 122.72, 124.25, 128.58, 141.81, 149.20, 150.44, 184.94.

[0119] **화합물 2: 데메톡시커큐민 (Demethoxycurcumin)**

[0120] [화학식 3]



[0121]

[0122] 1) 물성 : 주황색 분말 (m.p. 220 °C)

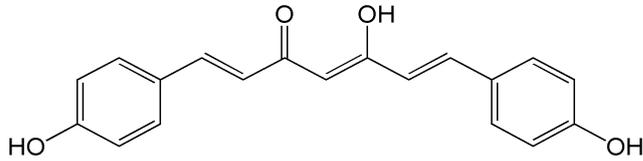
[0123] 2) 분자량 : 338

[0124] *3) 분자식 : C₂₀H₁₈O₅

[0125] 4) ¹H-NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz) δ 7.62-7.55 (4H), 7.34 (1H), 7.18 (1H), 6.89 (3H), 6.70 (2H), 5.97 (1H). ¹³C-NMR (acetone-*d*₆, 125 MHz) δ 56.38, 101.79, 111.53, 116.30, 116.89, 122.12, 122.35, 123.98, 127.77, 128.24, 131.06, 141.13, 141.48, 148.87, 150.13, 160.64, 184.66.

[0126] **화합물 3: 비스데메톡시커큐민 (Bisdemethoxycurcumin)**

[0127] [화학식 4]



[0129] 1) 물성 : 주황색 분말 (m.p. 224 °C)

[0130] 2) 분자량 : 308

[0131] 3) 분자식 : C₁₉H₁₆O₄

[0132] 4) ¹H-NMR (acetone-d₆, 500 Mhz) δ 7.62-7.56 (6H), 6.91-6.87 (4H), 6.68-6.65 (2H), 5.98 (1H). ¹³C-NMR (acetone-d₆, 125 Mhz) δ 101.82, 116.87, 122.11, 127.79, 131.06, 141.12, 160.58, 184.62.

[0133] **실시에 4: 울금 알코올 추출물 및 분획물의 HPLC 분석**

[0134] 상기 실시예 1 및 2로부터 얻어진 울금 추출물, 분획물 및 커큐미노이드계 화합물의 HPLC 크로마토그램을 실시하였다. 본 실시예에 사용된 HPLC 분석은 에이질런트 1200 시리즈 HPLC 기기로 동사의 펌프 시스템을 사용하였다. 본 실시예에서 사용한 검출기는 동사의 VWD(variable wavelength detector)를 이용하여 최상의 분석검출 파장인 260 nm에서 실험을 실시하였고, 용매의 유속은 1.0 ml/min으로 하였다. 시료 주입량은 10 µl로 각각 10 mg/ml의 농도로 조제하였다. HPLC 분석의 컬럼은 ZORBAX-SB-18 (5 µm, 150 mm x 4.6 mm)를 사용하여 분석 실시하였다. 이동상의 분석은 물 (0.1% TFA 함유)과 아세토니트릴 (0.1% TFA 함유)의 극성분배 조건으로 20% 아세토니트릴, 0 min; 25% 아세토니트릴, 10 min; 35% 아세토니트릴, 20 min; 50% 아세토니트릴, 30 min; 60% 아세토니트릴, 40 min; 70% 아세토니트릴, 50 min; 100% 아세토니트릴, 60 min으로 분석하였다.

[0135] 본 실시예를 통한 각각의 울금 추출물 및 분획물에 함유된 커큐미노이드계 화합물의 함량을 측정하기 위하여 커큐민, 데메톡시커큐민 및 비스데메톡시커큐민의 농도를 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 그리고 1000 µg/ml로 제조하여 상기 동일한 조건으로 분석하여 검정선을 구하였다.

[0136] 검정선을 토대로 각각의 울금 추출물 및 분획물의 커큐민, 데메톡시커큐민 및 비스데메톡시커큐민 함량을 측정 한 결과, 울금 에탄올 추출물에서는 커큐민 106 g/kg(추출물), 데메톡시커큐민 45.4 g/kg(추출물), 비스데메톡시커큐민 64.6 g/kg(추출물), 에틸아세테이트 분획물에서는 114.3 g/kg(분획물), 데메톡시커큐민 45.8 g/kg(분획물), 비스데메톡시커큐민 66.4 g/kg(분획물) 그리고 헥산 분획물에서는 커큐민 21.3 g/kg(분획물), 데메톡시커큐민 7.3 g/kg(분획물), 비스데메톡시커큐민 31.2 g/kg(분획물)의 함량을 나타내었다.

[0137] 정량 결과는 표 1에 나타내었다.

표 1

사용한 시료	함량		
	커큐민	데메톡시커큐민	비스데메톡시커큐민
울금 에탄올 추출물	106.0 g/kg(추출물)	45.4 g/kg(추출물)	64.6 g/kg(추출물)
울금 에틸아세테이트 분획물	114.3 g/kg(분획물)	45.8 g/kg(분획물)	66.4 g/kg(분획물)
울금 헥산 분획물	21.3 g/kg(분획물)	7.3g/kg(분획물)	31.2 g/kg(분획물)

[0138]

- [0139] 또한, 상기 검정선을 토대로 가을울금(*Curcuma longa* Linne)의 부위별 알코올 추출물의 커큐민, 데메톡시커큐민 및 비스데메톡시커큐민 함량을 측정된 결과, 덩이뿌리 부위에서는 커큐민 17.0 g/kg(추출물), 데메톡시커큐민 5.3 g/kg(추출물), 비스데메톡시커큐민 3.4 g/kg(추출물)이 검출되었고, 줄기 부위에서는 커큐민, 데메톡시커큐민 및 비스데메톡시커큐민이 검출되지 않았다. 그리고 뿌리줄기 부위에서는 커큐민 2.8 g/kg(분획물), 데메톡시커큐민 0.4 g/kg(분획물), 비스데메톡시커큐민 6.8 g/kg(분획물)의 함량을 나타내었다.
- [0140] 정량 결과는 표 2에 나타내었다.

표 2

사용한 시료	함량(g/Kg, 추출물)		
	커큐민	데메톡시커큐민	비스데메톡시커큐민
덩이뿌리 에탄올 추출물	17.0	5.3	3.4
줄기 에탄올 추출물	-	-	-
뿌리줄기 에탄올 추출물	2.8	0.4	6.8

- [0141]
- [0142] **실험예 1: 울금 추출물, 분획물 및 커큐미노이드계 화합물의 뉴라미니데이즈 A/Bervig-Mission/1/18 (rvH1N1) 저해 활성 측정**

- [0143] 본 발명의 실시예 1 및 2의 울금 추출물, 울금 분획물 및 이로부터 분리한 커큐미노이드계 화합물의 뉴라미니데이즈에 대한 저해활성을 측정하기 위하여, 1918년 스페인 독감으로부터 분리된 바이러스(A/Bervig_Mission/1/18)의 재조합 뉴라미니데이즈인 rvH1N1 인플루엔자 A 바이러스의 뉴라미니데이즈(R&D SYSTEM, 4858-NM)를 사용하였다. 기질은 2'-(4-트리메틸움벨리페릴)- α -D-N-아세틸-뉴라미닌산 나트륨염 [2'-(4-trimethylumbelliferyl)- α -D-N-acetyl-neuraminic acid sodium salt]을 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

- [0144] 실시예 1 및 2의 울금 추출물 및 이의 분획물을 메탄올에 녹여 각각 20 μ L씩 첨가하고 기질로는 2'-(4-트리메틸움벨리페릴)- α -D-N-아세틸-뉴라미닌산 나트륨염 (최종농도, 200 μ M)을 50 μ L 넣고, 5 mM CaCl₂와 200 mM NaCl이 첨가된 트리스 완충용액(pH 7.5) 80 μ L와 혼합하였으며, 효소원인 뉴라미니데이즈(효소 최종농도, 0.05 ng/ μ L) 50 μ L을 첨가하여 25 $^{\circ}$ C 상온에서 10분 동안 반응시키고 형광 분광기로 365 nm에서의 흡광과 445 nm에서의 발광을 측정함으로써 뉴라미니데이즈의 저해 활성을 측정하였다.

- [0145] 측정 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

물질	뉴라미니데이즈 저해활성(IC ₅₀) ¹⁾
	A/Bervig-Mission/1/18 (rvH1N1)
울금 에탄올 추출물	3.1 μ g/mL
울금 헥산 분획물	262.0 μ g/mL
울금 에틸아세테이트 분획물	0.9 μ g/mL
울금 물분획물	61.5 μ g/mL
커큐민	3.0 μ M
데메톡시커큐민	3.0 μ M
비스데메톡시커큐민	6.0 μ M

[주] 1) : 두 번 실험의 평균값으로 결과를 나타내었다.

- [0147] 상기 표 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 울금 추출물 및 분획물, 커큐미노이드계 화합물 각각의 뉴라미니데이즈에 대한 저해 활성을 측정된 결과, 울금 에탄올 추출물은 인플루엔자바이러스원의 뉴라미니데이즈에 대

해 3.1 µg/mL의 IC₅₀값을 보여주었고, 울금 핵산 분획물은 262.0 µg/mL, 울금 에틸아세테이트 분획물은 0.9 µg/mL, 그리고 울금 물 분획물은 61.5 µg/mL의 IC₅₀값을 보여 주었다. 또한 커큐미노이드계 화합물인 커큐민 및 데메톡시커큐민은 3.0 µM, 비스데메톡시커큐민은 6.0 µM의 IC₅₀값을 보여 주었다. 따라서, 상기와 같은 결과를 통해 본 발명에 따른 울금 추출물, 이의 분획물 및 커큐미노이드계 화합물이 우수한 뉴라미니테이즈 저해 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0148] **실험예 2. 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계, 에틸아세테이트 분획물 및 에탄올 추출물의 인플루엔자 바이러스에 대한 저해 효과 측정**

[0149] 먼저, 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물의 인플루엔자 바이러스 H1N1 (A/PR/8/34) 및 H9N2 (A/Chicken/Korea/MS96/96)]에 대한 살바이러스 효과를 측정하기 위하여, 개의 신장세포주인 MDCK (Madin-Darby canine kidney, ATCC: CCL-34)를 이용하여 다음과 같은 *in vitro* 실험을 수행하였다.

[0150] 먼저, 96 well microplate에 MDCK세포를 각 well 당 1×10^5 / well 이 되도록 넣고 배지 EMEM (penicillin 100 units, streptomycin 100 µg, 10% FBS)로 배양하였다. MDCK 세포가 monolayer가 되면 항생제만 포함된 EMEM 배지로 2회 세척하였다. H1N1 및 H9N2주를 각각 100 TCID₅₀이 되도록 희석하여 EP 튜브에 담아 두었다. 여기에 DMSO (dimethylsulfoxide)로 희석한 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물을 농도별로 각 튜브에 넣은 후 4°C에서 1시간 동안 반응 시켰다. 1시간 후 상기 반응액을 미리 세척한 MDCK 세포에 한 농도 당 3 well씩 각각 접종하여 35°C에서 1시간 동안 배양하였다(이하, 샘플 처리군이라 함). 한편, 비감염+비투여 대조군(Control, H1N1 또는 H9N2주를 감염시키지 않고, 커큐미노이드계 화합물을 투여하지 않은 세포군) 및 감염+비투여 대조군(Virus control, H1N1 또는 H9N2주를 감염시킨 후, 커큐민을 투여하지 않은 세포군)을 동일한 조건에서 MDCK 세포에 접종하여 35°C에서 1시간 동안 배양 하였다. 1시간 후 plate의 배지를 모두 제거하고 PBS로 1회 세척 후, 항생제와 10 µg/mL trypsin이 첨가된 EMEM 배지를 각 well에 100 ml씩 분한 후, 35°C에서 48-72시간 배양하였다. 감염+비투여 대조군에서 완전히 세포변성효과(Cytopathic effect, CPE)가 나올 때까지 48-72 시간 배양하였다. 도립현미경으로 매일 세포 상태를 관찰하였다. 배양 48-72 시간 후 세포 생존율을 알아보기 위하여 Cell Counting kit-8 (Dojin, Kumanoto, Japan, tetrazolium salt WST-8)을 각 well당 10 ml 씩 넣은 후 35°C에서 2시간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 비감염+비투여 대조군 및 감염+비투여 대조군과 본 발명의 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물이 나타내는 살바이러스 효과(저해도(%))를 하기 수학적 식 1에 의해 비교한 후, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

수학적 식 1

$$\text{저해도(\%)} = \frac{\text{샘플 처리군 (O.D) 값} - \text{감염+비투여 대조군 (O.D) 값}}{\text{비감염+비투여 대조군 (O.D) 값} - \text{감염+비투여 대조군 (O.D) 값}} \times 100$$

[0151]

[0152] 상기 식에서, O.D 값은 450 nm에서 측정된 흡광도 값을 의미한다.

[0153] 한편, 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 및 에탄올 추출물의 인플루엔자 바이러스 H1N1 (A/PR/8/34) 및 H9N2 (A/Chicken/Korea/MS96/96)]에 대한 세포변성억제효과를 알아보기 위해, 항생제만 포함된 EMEM 배지로 2회 세척한 MDCK 세포에 인플루엔자 바이러스 (H1N1 또는 H9N2주)를 접종하여 1시간 동안 35°C에서 배양하였다. 1시간 후 접종한 바이러스액을 모두 제거하고, 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 및 에탄올 추출물을 바이러스가 접종된 MDCK 세포에 넣어주었다. 이후, 위와 동일한 방법으로 본 발명의 울금 추출물로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 및 에탄올 추출물이 나타내는 세포변성억제효과(저해도(%))를 상기 수학적 식 1에 의해 비교한 후, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

물질	살바이러스 효과					
	H1N1(A/PR/8/34)			H9N2(A/Chicken/Korea/MS96/96)		
	CC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b	SI ^c	CC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b	SI ^c
Tamiflu	>200	18.5	>10.8	>200	<1	>200
커클민	94.1	7.1	13.3	94.1	18.6	5.1
데메톡시 커클민	97.0	8.0	23.1	97.0	18.2	5.3
비스데메톡시 커클민	>200	28.1	>7.1	>200	>200	<1
에틸아세테이트 분획물	82.1 μ g/mL	9.0 μ g/mL	9.1	82.1 μ g/mL	20.0 μ g/mL	4.1
에탄올 추출물	55.7 μ g/mL	8.7 μ g/mL	6.4	55.7 μ g/mL	30.4 μ g/mL	1.8
물질	세포변성억제 효과					
	H1N1(A/PR/8/34)			H9N2(A/Chicken/Korea/MS96/96)		
	CC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b	SI ^c	CC ₅₀ (μ M) ^a	EC ₅₀ (μ M) ^b	SI ^c
Tamiflu	>200	3.0	>66.7	>200	<1	>200
커클민	94.1	40.7	2.3	94.1	10.9	8.6
데메톡시 커클민	97.0	60.8	1.6	97.0	24.9	3.9
비스데메톡시 커클민	>200	141.5	>1.4	>200	181.6	>1.1
에틸아세테이트 분획물	82.1 μ g/mL	23.5 μ g/mL	3.5	82.1 μ g/mL	11.6 μ g/mL	7.1
에탄올 추출물	55.7 μ g/mL	27.8 μ g/mL	2.0	55.7 μ g/mL	31.5 μ g/mL	1.8
[주] ^a CC ₅₀ , 세포독성 농도로부터의 평균(50%) 값 ^b EC ₅₀ , 억제효과 농도로부터의 평균(50%) 값 ^c SI, 선택지수, CC ₅₀ / EC ₅₀						

[0155]

a, 커클미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물과 바이러스를 섞어 4°C에서 1시간 동안 반응 시키고 MDCK 세포에 감염시킨 1시간 후 PBS로 1회 세척 후 trypsin 10 mg/ml이 첨가된 EMEM 배지로 교환하여 35°C에서 48-72시간 배양함.

[0156]

b, 바이러스를 MDCK 세포에 감염시킨 1시간 후 바이러스를 포함하는 medium을 제거한 후 커클미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물을 포함하는 medium을 넣고 48-72시간 배양함.

[0157]

c, 선택지수로서 CC₅₀ / EC₅₀의 값임.

[0158]

상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 커클미노이드계 화합물들은 H1N1주에서 살바이러스 효과를 보여주는 선택지수(selective index, SI)가 13.3, 23.1 및 7.1 이상으로 우수한 살바이러스 효과를 보여주었다. 또한, H9N2에서도 선택지수 5.1, 5.3 및 1.0 이하를 보여주어 다양한 바이러스 주에 대한 살바이러스 효과를 나타내었다. 울금 에틸아세테이트 분획물은 H1N1 균주에서 선택지수 9.1, 울금 에탄올 추출물은 6.4로 아주 우수한 살바이러스 효과를 보여주었다. 또한, 도립현미경 상에서 세포 형태를 관찰한 결과, 바이러스만을 접종한 군(H1N1, H9N2)은 MDCK세포가 거의 파괴되어 90-100% 세포 변성효과가 나왔으나, 바이러스와 커클미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물을 처리한 샘플처리군은 MDCK 세포에 아무것도 처리하지 않은 비감염+비투여대조군과 유사한 것을 확인하였다.

[0159]

뿐만 아니라 커클미노이드계 화합물들은 H1N1과 H9N2 세포변성억제효과를 보여주었다. 특히, H9N2주에서 선택지수 8.6, 3.9 및 1.1 이상으로 아주 좋은 세포변성억제 효과를 보여주었으며, H1N1 균주에서도 선택지수 2.3, 1.6 및 1.4 이상으로 세포변성억제 효과를 나타내었다. 또한, 도립현미경 상에서 세포 형태를 관찰한 결과, 바이러스만을 접종한 군(H1N1, H9N2)은 MDCK세포가 거의 파괴되어 90-100% 세포 변성효과가 나왔으나, 바이러스와 커클미노이드계 화합물, 에틸아세테이트 분획물 또는 에탄올 추출물을 처리한 군은 MDCK 세포에 아무것도 처리

하지 않은 비감염+비투여대조군과 유사한 것을 확인하였다.

[0160] 따라서, 본 발명의 조성물은 바이러스가 세포에 감염되기 전 바이러스에 직접 작용하여 살바이러스 효과를 나타내고, 또한 바이러스가 세포에 감염된 후 복제과정을 통하여 세포 외로 방출되지 못하게 함으로써 세포변성에도 우수한 억제효과를 나타내므로, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 감염 후 치료용으로도 유용하게 사용될 수 있다.

[0161] **실험예 3: 본 발명의 화합물의 급성 독성 실험**

[0162] 본 발명의 화합물들에 대한 급성 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0163] 6주령의 특정 병원체 부재(SPF, specific pathogens free) C57BL/6J 마우스를 암수 각각 12 마리씩 4군(암수 각각 3마리/실험군)으로 나누어, 온도 22± 3℃, 습도 55± 10%, 조명 12L/12D의 동물실내에서 사육하였다. 마우스는 실험에 사용되기 전 1주일 정도 순화시켰다. 실험동물용 사료(마우스 및 랫트용, (주)제일제당, 서울, 대한민국) 및 음수는 멸균한 후 공급하였으며 자유 섭취시켰다.

[0164] 상기 실시예 2에서 제조한 상기 화학식 2 내지 화학식 4로 표시되는 화합물들을 각각 0.5% 트윈 80(tween 80)에 50 mg/mL 농도로 조제한 후, 마우스 체중 20 g 당 0.04 mL(100 mg/kg), 0.2 mL(500 mg/kg) 및 0.4 mL(1,000 mg/kg)씩 경구 투여하였다. 시료는 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 7일 동안 다음과 같이 부작용 또는 치사 여부를 관찰하였다. 즉, 투여당일은 투여 후 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 뒤에, 그리고 투여 익일부터 7일째까지는 매일 오전, 오후 1회 이상씩 일반증상의 변화 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

[0165] 상기와 같은 급성 독성실험 결과, 시료를 투여한 모든 마우스에서 특기할 만한 임상증상이 나타나지 않았고 폐사된 마우스도 없었으며, 또한 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검조건 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

[0166] 따라서, 본 발명의 화합물들은 모든 마우스에서 1,000 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소 치사량(LD₅₀)이 1,000 mg/kg 이상인 안전한 물질임을 확인할 수 있었다.

[0167] 이하, 울금 추출물, 울금 분획물, 이로부터 분리된 커큐미노이드계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 함유한 약학적 제제 또는 건강식품의 제조예를 설명한다.

[0168] **제조예 1: 약학적 제제의 제조**

[0169] **1-1. 산제의 제조**

[0170]	울금 추출물, 분획물, 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염	2 g
[0171]	유당	1 g

[0172] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0173] **1-2. 정제의 제조**

[0174]	울금 추출물, 분획물, 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염	100 mg
[0175]	옥수수 전분	100 mg
[0176]	유당	100 mg
[0177]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0178] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0179] **1-3. 캡슐제의 제조**

- [0201] **2-6. 유제품(dairy products)의 제조**
- [0202] 울금 추출물, 분획물, 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염 0.1 ~ 1.0 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0203] **2-7. 선식의 제조**
- [0204] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0205] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0206] 울금 추출물, 분획물 및 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.
- [0207] 상기에서 제조한 곡물류; 종실류; 및 울금 추출물, 분획물, 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- | | | |
|--------|-----------------------------------|--------|
| [0208] | 곡물류(현미 35중량%, 울무 15중량%, 보리 25중량%) | 75중량% |
| [0209] | 종실류(들깨 7중량%, 검정콩 9중량%, 검정깨 7중량%) | 23중량% |
| [0210] | 울금 추출물, 분획물, 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염 | 1중량% |
| [0211] | 영지 | 0.5중량% |
| [0212] | 지황 | 0.5중량% |
- [0213] **2-8. 탄산음료의 제조**
- [0214] 설탕 5~10중량%, 구연산 0.05~0.3중량%, 카라멜 0.005~0.02중량%, 비타민 C 0.1~1중량%의 첨가물을 혼합하고, 여기에 정제수를 전체 조성물이 100중량%가 되도록 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 85~98 ℃에서 20~180 초간 살균한 후 냉각수와 1:4의 부피 비율로 혼합하여 음료 조성물을 제조한 다음 탄산가스를 상기 음료 조성물의 0.5~0.82부피% 정도로 주입하여 울금 추출물, 분획물, 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염을 함유하는 탄산음료를 제조하였다.
- [0215] **2-9. 건강음료의 제조**
- [0216] 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량%), 식염(0.5중량%), 물(94중량%)과 같은 부재료와 울금 추출물, 분획물, 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염(1중량%)을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.
- [0217] **2-10. 야채주스의 제조**
- [0218] 울금 추출물, 분획물, 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염 0.5g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.
- [0219] **2-11. 과일주스의 제조**
- [0220] 울금 추출물, 분획물, 이로부터 분리한 화합물 또는 이의 염 0.1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.