(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0135424
(43) 공개일자 2010년12월27일

(51) Int. Cl.
A61K 36/484 (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0053774
(22) 출원일자 2009년06월17일
심사청구일자 2009년06월17일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
이기업
경기도 양평군 양서면 중동리 469번지
박중열
서울특별시 송파구 잠실4동 파크리오아파트 221동 2102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
백경업, 이문욱, 민병준

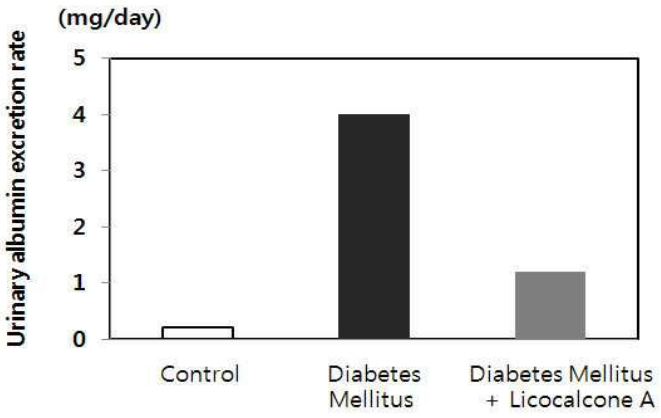
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 디디에이에이치를 활성화시키는 감초 유래의 칼콘 화합물 및 이를 유효성분으로 하는 췌장 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 세포 기능장애 및 당뇨병성 합병증의 예방 또는 치료용 활성을 갖는 칼콘(chalcone)계 성분을 함유하는 감초(*Glycyrrhiza uralensis*, Licorice)로부터 추출된 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 감초의 알코올 조 추출물을 용매 분획한 후, DDAH(dimethylarginine dimethylaminohydrolase)의 활성을 증가시키는 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 화합물 1~7을 포함하는 감초 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 화합물 중 어느 하나를 유효성분으로 함유하여 이루어지는 조성물은 DDAH 활성도의 증가를 통하여 췌장 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

고은희

서울특별시 송파구 풍납1동 동아한가람아파트 105동 303호

오원근

광주광역시 북구 두암1동 현대아파트 105동 1061호

다오 트롱 투완

톤 비치, 민 튜안, 부 반, 남 딘, 베트남

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M10642140004-06N4214-00411

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 나노바이오연구개발사업

연구과제명 당뇨병 노화 합병증의 제어 기술 개발

기여율

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2006년 11월 01일 ~ 2009년 07월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

감초를 에탄올 용매로 추출한 후 농축하여 제조하는 것으로서, 리코칼콘 F(licochalcone F), 에치나틴(echinantin), 리코칼콘 D(licochalcone D), 리코칼콘 A (licochalcone A), 리코아그로칼콘 A(licoagrochalcone A), 5-프레닐부테인(5-prenylbutein) 및 칸조놀 C(kanzonol C)의 화합물 중 적어도 한가지 이상이 포함되 는 것으로 특징으로 하는 췌장 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 치료용 감초 추출물.

청구항 2

제 1 항의 감초 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 췌장 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 3

제 2 항에 있어서 ,

상기 건강기능식품은 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스넥류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료 등을 포함한 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 4

제 1 항의 감초 추출물을 유효성분으로 포함하고 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 함유하는 췌장 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 조성물은 DDAH(dimethylarginine dimethylaminohydrolase) 효소의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 6

리코칼콘 F, 에치나틴, 리코칼콘 D, 리코칼콘 A, 리코아그로칼콘 A, 5-프레닐부테인 및 칸조놀 C의 화합물 중 적어도 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 췌장 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 조성물은 DDAH 효소의 활성을 증가시키는 것임을 특징으로 하는 췌장 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 당뇨병성 합병증의 예방 및 치료용 활성을 갖는 감초(*Glycyrrhiza uralensis*, Licorice)로부터 추출된 칼콘(chalcone)계 성분을 함유하는 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 감초의 알코올 조 추출물을 용매 분획한 후, DDAH (dimethylarginine dimethylaminohydrolase)의 활성을 증가시키는 에틸아세테이트 분획으로부터 분리한 화합물 1~7중에 적어도 하나를 포함하는 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당뇨병은 만성적 고혈당 상태를 특징으로 하는 질환으로서 대사조절이 적절히 이루어지지 않을 경우 망막증, 신장병증, 신경병증 등의 미세혈관 합병증과 동맥경화증, 당뇨병성 신증 등의 만성 합병증을 초래하게 되는 만성질병이다. 국내의 당뇨병 환자수는 1994년에 제 1형 약 9만 2천명, 제 2형 약 120만 명이며 2010년에는 제 1형 13만 명, 제 2형 170만 명으로 증가될 전망이다.

[0003] 그러나 이 숫자는 명백한 고혈당이 증명된 현성 환자만을 대상으로 추정한 것이며 경구 당 부하 검사를 시행할 경우에는 그 수가 2배 이상으로 증가할 것으로 사료되며 만성 합병증, 수족 절단 등 정상적인 생활이 불가능한 상황까지 발생할 수도 있어 이미 당뇨병이 사회적으로 큰 문제가 되고 있다. 성인 실명의 가장 큰 원인이 당뇨병이며(24,000명/년), 신부전등으로 투석을 시작하는 경우의 1/3 이상도 당뇨병이 원인이 되고 있으며 이 증상은 성인 신부전의 가장 중요한 원인까지 되고 있다. 이상과 같이 질환의 특성상 환자가 사망하지는 않으나 안질환 관련 합병증, 신장 합병증 등의 만성 합병증에 시달리게 되고 그 합병증의 관리에 천문학적인 비용이 들어 미국의 경우 연간 천억불 이상의 의료비가 지출되고 있으며 독일에서도 200억불의 의료비가 당뇨병으로 지출되어 만성 단일질환으로는 최대액수를 기록하고 있다.

[0004] 한국인 제2형 당뇨병의 역학적 특성은 잘 알려진 대로 서구와는 달리 신체질량지수가 27kg/㎡ 이상인 환자의 약 20%, 신체질량지수 25kg/㎡을 기준으로 하여도 약 35% 정도의 환자만이 비만형으로 보고되고 있다.

[0005] 우리나라의 제 2형 당뇨병 환자는 70~80%가 비(非)비만형이며, 인슐린으로 치료받는 환자가 더 많다. 제 2형 당뇨병은 원래 말초 조직의 인슐린 저항성과 베타세포의 보상부전으로 발생되는 대사질환으로 알려져 있다. 인슐린 저항성이 증가된 내당능장애의 경우 베타세포의 부족한 인슐린을 보상하기 위해 인슐린 분비가 증가되고 이와 더불어 베타세포가 증식하여 혈당의 상승을 억제하지만, 보상에 실패하여 베타세포 부전이 발생하게 되면 인슐린 분비가 감소되고, 이러한 여러 원인으로 증가된 세포자연사(apoptosis)로 베타세포 양이 감소하여 혈당이 증가되어 당뇨병으로 가속화된다.

[0006] NO(Nitric oxide)는 산화 스트레스 반응, 다양한 방어 기전, 신경 전달, 기능 조절 등 필수적인 신체 반응에 관여하는 중요 물질이다. NO는 NOS(Nitrous Oxide Systems)를 통해 생성되는데 인체 내에서 내인성 NOS 저해제 알려진 ADMA(asymmetric dimethylarginine)는 심혈관 질환 및 이를 유발하는 많은 임상적 상황인 고콜레스테롤혈증, 고호모시스테인혈증, 고혈압, 인슐린저항성, 당뇨병, 당뇨병으로 유발되는 여러가지 질병 등과 연관되어 있음이 확인되었다. 대부분의 ADMA는 DDAH(dimethylarginine dimethylaminohydrolase)라는 효소에 의해 시트룰린(citrulline)과 디메틸아르기닌(dimethylarginine)으로 분해된다.

[0007] 따라서, DDAH의 효소 활성으로 ADMA 농도가 결정되므로, DDAH는 ADMA를 통해 NOS의 활성도 및 NO 생성을 조절한다고 할 수 있고 DDAH 활성화 또는 기능 장애의 개선을 통한 ADMA 농도 감소는 NO 생성을 조절하는 표적이 될 수 있다. 현재까지 ADMA 농도 감소를 위한 DDAH의 활성을 유도하기 위한 노력으로, 산화스트레스를 예방하거나 산화된 DDAH를 다시 환원시키고자 하는 연구는 일부 시행되었지만 화합물로서 이를 근원적으로 조절하려는 연구는 부족한 편이다. 흥미로운 사실은 베타세포 기능저하 및 인슐린 저항성 발생에 소포체 스트레스(ER stress)가 관여된다고 보고되고 있는데(Science, 306, 425-426, 2004), 연골세포(chondrocyte) 및 마이크로글리아 세포(microglial cell)에 각각 NO 공여체(donor)를 처리하거나 NOS 발현을 증가시켰을 때 소포체 스트레스가 유도되었다는(J. Cell Physiol., 204(1), 45-50, 2005) 결과를 토대로 NO의 발생이 베타세포 기능 저하 및 인슐린 저항성 발생과 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

[0008] 이는 베타세포에서 NOS 활성 증가가 소포체 스트레스를 유도하여 베타세포 기능저하 및 인슐린 저항성 발생에 관여할 가능성을 시사한다. 또한 베타세포의 파괴와 세포 자살 유도(apoptosis)에는 IL-1β 등의 싸이토카인이 관여하며 이러한 싸이토카인에 의한 인슐린분비 장애에는 주로 NO가 관여됨이 보고되고 있다.

[0009] 따라서 NO의 조절은 베타세포의 파괴를 막고 인슐린 분비 장애를 호전시킬 수 있으므로 NO 생성에 관여하는 DDAH의 활성의 조절은 당뇨병 치료의 새로운 목표점이 될 수 있다.

[0010] 당뇨병성 신증은 최근 말기신부전 환자의 가장 중요한 원인질환으로서, 대한 신장학회의 2002년 통계에 의하면 전체 투석 환자의 원인 질환 중 40%를 차지하고 있다. 전 세계적으로도 이와 비슷한 빈도를 보이며 특히 제 2형 당뇨병에 의한 말기신부전 환자는 10년 후 현재의 2배에 이를 것으로 예견되었다. 이렇게 당뇨병성 신증이 현저히 증가하는 이유는 당뇨병의 발생연령이 더 빨라지고 당뇨병 환자의 수명이 연장됨에 따라 당뇨병 합병증으로서의 신증 환자가 증가하기 때문이라고 알려져 있다. 당뇨병성 신증이 갖는 또 다른 임상적 중요성은 현저한 사망률의 증가에 있다. 즉 현성단백뇨가 동반된 제 1형 당뇨병환자는 정상인에 비해 사망률이 20-40배가 높은 반

면, 정상 알부민뇨를 갖는 제1형 당뇨병 환자는 정상인에 비해 사망률이 단지 2배 높을 뿐이다. 당뇨병 치료제의 국내 시장 규모는 2005년에 약 3000억원에 달하며, 당뇨병성 신장합병증의 진행을 억제하는 것으로 알려진 ACE(angiotensin converting enzyme) 억제제 및 ARB(angiontensin receptor blocker)의 2005년 국내 시장 규모는 3285억원에 달한다. 대한 신장학회의 '2004년 우리나라 신 대체 요법의 현황'에 대한 보고에 따르면 만성 신부전의 원인질환으로 당뇨병성 신증이 43.4%를 차지하고 그 뒤로 고혈압성 사구체경화증 16.2%, 만성 사구체 신염이 12.5%를 각각 차지함으로써 우리나라에서도 인구 고령화로 인한 당뇨병과 같은 만성질환에 따른 신장질환자 증가 추세가 고착화되고 있음을 알 수 있다.

[0011] 최근 ADMA의 농도가 만성신장질환이 있는 환자에서 신기능 악화의 강력한 예측인자임이 보고되고 있으며(J. Am. Soc. Nephrol., 16(8), 2456-2461, 2005), 또한 최근 당뇨병성 신증의 발생과 진행에 관여하는 간질성 허혈(tubulointerstitial ischemia)에 ADMA 농도의 상승이 관여하며 DDAH 활성 증가가 ADMA를 유의하게 줄이고 NO를 감소시킴으로써 당뇨병성 신증에서 신기능을 향상시킬 수 있을 것이라는 보고가 있다(Nephrol. Dial. Transplant., 24(4), 1162-1169, 2009). 따라서 DDAH를 활성화시킴으로써 당뇨병성 신증의 치료를 가능하게 할 수 있을 것이다.

[0012] 일반적으로 새로운 성분의 약제를 개발하기 위한 여러 가지 방법 중, 기존 약제의 실험적 변형에 의한 노력보다는 전통 의학에서 사용되고 있는 천연물 약제들로부터 새로운 활성 성분을 발견할 수 있는 가능성이 매우 높으며 이러한 활성 성분들은 오랫동안 사용되어 왔기 때문에 약물들에 의한 독성 염려가 적은 장점이 있다. 따라서, 본 발명자들은 천연물로부터 독성이 적은 새로운 당뇨병 합병증 및 신증 치료물질을 개발하기 위하여 DDAH 활성도를 증가를 측정하는 방법을 사용하여 1,500여종의 천연물 소재를 탐색한 결과 감초가 강한 활성을 나타냄을 알고 활성 화합물의 분리정제 및 구조를 확인한 후 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 감초(*Glycyrrhiza uralensis*, Licorice)는 시베리아 동부와 중국 동북부가 원산인 콩과의 다년초로서 뿌리가 달기 때문에 감초라고 하며 약방의 감초라고 할 정도로 한방약에 거의 포함되는 매우 중요한 생약이다. 감초는 일반적으로 한방약의 맛을 순하게 하고 효력을 촉진시키는 효과로서 알려져 있기에 본 발명에서의 당뇨병 및 당뇨병성 신증 예방 및 치료와 큰 관련성을 갖는다. 이러한 감초와 관계된 특허 및 문헌으로 감초 추출물을 이용한 경우는, 구운 감초 추출물을 포함하는 골질환 예방 및 치료용 약학조성물(대한민국 등록특허 제684194호), 당뇨합병 및 예방을 위한 조성물(PCT 출원, 2005074963), 티아졸리딘 화합물의 부작용 개선 및 증진 조성물(PCT 출원, 20060410884) 등이 있으나 이는 추출물 중에서 활성을 보여주는 화합물을 확인한 본 특허와는 관련성이 없다.

[0014] 감초에서 알려진 화합물을 이용한 특허의 경우, 본 특허에서 주장하는 화합물 4(리코칼콘 A)와 비슷한 리코칼콘 E를 이용한 특허로 "리코칼콘 E 및 이를 포함하는 항암조성물 (대한민국 등록특허 제564811호)", "항혈전 효과를 나타내는 칼콘 유도체와 그를 포함하는 약학적 조성물 및 그의 제조방법 (대한민국 등록특허 제378091호)" 등이 있다. 또한, 리코칼콘류를 포함하는 화합물을 이용한 퍼록시좀 수용체를 활성화하여 인슐린저항성에 사용 가능하다는 "퍼록시좀 증식제 응답성 수용체 리간드제 및 그의 제조방법(PCT, JP2002/010572)"과 본 특허의 내용 또한 다르며, 평활근에서 리코칼콘 A의 평활근 세포의 증식억제효과를 다룬 논문(Park JH, et al, Biol Pharm Bull., 31(11), 1996-2000, 2008)도 본 특허의 DDAH를 조절하여 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 및 치료에 사용할 수 있다는 특허와 다르다.

[0015] 최근 미국특허 US 2007/0149466 A1는 본 발명에서 주장하는 칼콘의 일부 화합물이 미토콘드리아에서 서투인(SIRT1) 효소를 활성화하여 비만과 당뇨에 대한 치료제로 사용할 수 있다고 보고하고 있으나 본 특허의 내용인 DDAH를 활성화시키는 칼콘 화합물 및 이를 유효성분으로 하는 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 치료용 조성물과는 중복되지 않으며 더욱이 치환기의 구조가 명확히 다르다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0016] 따라서 본 발명의 목적은 감초로부터 순수하게 분리 정제하여 DDAH 활성화 작용을 갖고, 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 치료 효과를 나타내는 화합물을 유효성분으로 함유하는 화합물을 제공함에 있다. 본 발명의 다른 목적은 감초로부터 순수하게 분리 정제하여 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 및 치료 효과를 나타내는 화합물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공함에 있다.

과제 해결수단

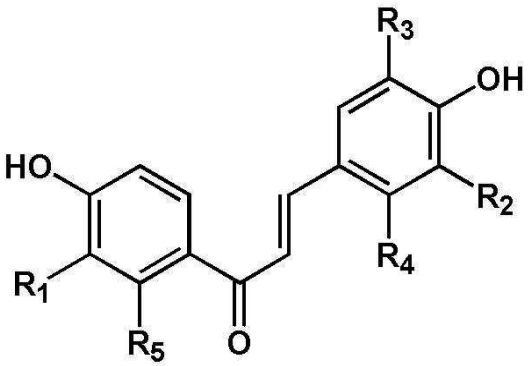
[0017] 본 발명자들은 상기에 기술된 내용을 감안하여 각종 자생식물 및 한약재를 채집하여 DDAH 활성화 작용을 조사하는 과정을 통하여 감초를 후보식물로 선정하였다.

[0018] 본 발명에 따른 DDAH 활성 화합물은 감초로부터 유기용매 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올 등) 또는 수용성 알코올에 의한 추출, 유기용매와 물의 분배, 칼럼크로마토그래피에 의한 방법 등, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합하여 용이하게 얻을 수가 있다. 조추출물은 필요에 따라서 상법에 따라서 더욱 정제할 수 있다.

[0019] 본 발명은 바람직하게 감초를 에탄올로 추출한 후 크로마토그래피를 이용하여 순수 분리 정제하고 화학구조 및 물리화학적 특성규명을 통하여 구조를 확인한 다수의 칼콘계 화합물 중 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 리코칼콘 F(화합물 1), 에치나틴(화합물 2), 리코칼콘 D(화합물 3), 리코칼콘 A(화합물 4), 리코아그로찰콘 A(화합물 5), 5-프레닐부테인(화합물 6), 칸조놀 C(화합물 7)가 높은 DDAH 활성화 작용을 갖음을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

[0020] 상기 화합물은 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 치료 효과를 위한 DDAH 효소의 활성화용 약제 물질 중에서 적어도 하나의 용도로 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0021] **(화학식 1)**



(1) Licochalcone F : R_1=R_2= H, R_3= , R_4= OCH_3, R_5= OH

(2) Echinatin : R_1=R_2=R_3=R_5= H, R_4= OCH_3

(3) Licochalcone D : R_1= , R_2= OH, R_3=R_5= H, R_4= OCH_3

(4) Licochalcone A : R_1=R_2=R_5= H, R_3= , R_4= OCH_3

(5) Licoagrochalcone A : R_1=R_3=R_4= H, R_2= , R_5= OH

(6) 5-Prenylbutein : R_1=R_4= H, R_2= , R_3=R_5= OH

(7) Kanzonol C : R_1=R_2= , R_3=R_4= H, R_5= OH

[0022]

[0023] 상기 화합물은 감초로부터 유래된 것일 수 있다. 상기 화합물은 에탄올 추출물로부터 유래된 것일 수 있다. 본 발명에 따른 DDAH 효소의 활성화용 약제 조성물은, 상기 화합물 중 적어도 하나의 화합물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명에 따른 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증 예방 또는 치료용 조성물은 상기 화합물 중 적어도 하나의 화합물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0025] 상기 화합물은 감초를 에탄올로 추출하고 크로마토그래피를 이용하여 DDAH 효소의 활성화용 칼콘계 화합물을 고압속액체크로마토그래피법 (HPLC)을 이용하여 분석 및 분리 정제하는 단계; 상기 단계에서 얻은 칼콘계 화합물의 화학구조 및 물리화학적 특성을 조사하는 단계; 상기 단계의 화합물의 DDAH 효소의 활성화를 조사하는 단계;

및 상기 단계에서 얻은 화합물을 포함하는 분획물의 베타세포 사멸 예방 효과 측정 및 경구투여에 의한 동물 실험단계를 포함하는 제조 과정을 통해 얻어질 수 있다.

[0026] 본 발명자는 물리화학적 특성 및 핵자기공명 스펙트럼의 해석으로부터 본 발명에 따른 화합물은 상기 화학식 1로 분석되는 일련의 화합물임을 확인하였고 상기화합물의 DDAH 효소의 활성화 작용, 상기 화합물을 포함하는 분획 중 대표화합물인 리코칼콘 A의 베타세포 사멸 예방 효과 및 경구투여에 의한 동물효능 효과를 규명하였다.

[0027] 본 발명에 따른 DDAH 효소의 활성화 화합물은 감초로부터 유기용매(알코올, 에테르, 아세톤 등) 추출, 헥산과 물의 분배, 칼럼크로마토그래피 등, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적합하게 조합하여 용이하게 얻을 수가 있다. 조추출물은 필요에 따라서 상법에 따라서 더욱 정제할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 사용하는 크로마토그래피에는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (silica gel column chromatography), 엘에이취-20 칼럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등이 이용될 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 칼콘계 화합물은 DDAH 효소의 활성화에 작용하므로 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료에 효능이 있어 유리하게 활용할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 칼콘계 화합물은 감초로부터 쉽게 분리할 수 있을 뿐만 아니라 안정도도 높으므로 식품, 의약품의 첨가제로 이용할 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 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, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 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, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0032] 상기 활성성분의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.001㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1㎎/㎏/일 내지 200㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 추출물은 쥐, 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 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 추출물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 감초 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 동맥경화증의 예방을 위한 건강 기능 식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다. 상세하게는, 본 발명은 감초 추출물을 유효성분으로 함유하는 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 베타세포 사멸 및 당뇨병성 신증의 예방 및 치료용 건강 기능 식품을 제공한다.

효 과

[0034] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 감초 유래의 추출물 및 이로부터 분리한 화학식 **1**로 표시되는 화합물은 DDAH 효소의 활성화 작용이 강하고, NO의 이상 과발현에 의하여 발생하는 세포의 자살유도를 저해하여 당뇨병성 신증 및 췌장세포의 파괴로 인한 당뇨병 합병증 등의 질병에 대한 예방 및 치료의 효과를 기대할 수 있다.

[0035] 또한 전통적으로 감초가 한의학에서 약방의 감초라고 할 정도로 많은 한약재에 병용해서 처방되어 사용된 안정성이 입증된 천연물이고 이로부터 분리 정제된 추출물이기에 안전성이 우수하여 의약품, 화장품 및 식품 산업 등에 매우 유용하게 사용 및 응용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 본 발명을 실시예 및 제제예에 따라 더욱 상세히 설명하되, 본 발명의 범위가 다음의 실시예 및 제제예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0037] <실시예 1: DDAH 활성화 물질의 분리 및 정제>

[0038] 감초의 건조된 뿌리 3kg을 에탄올 10ℓ로 1주일간 실온에서 추출하였다. 상기 에탄올 추출물을 감압 농축한 후 이 추출물 350g을 물로 현탁한 후 n-헥산, 에틸 아세테이트, 부탄올로 순차적으로 용매 분획한 다음 각각의 용매 분획에 대하여 DDAH 활성을 측정한 결과, 에틸 아세테이트 분획에서 강한 활성을 나타내었다. 에틸 아세테이트 분획 50g을 헥산-아세톤 4:1 → 0:1의 용매 구배 조건으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 6개의 분획을 얻었다(fr.1~6). 이 분획들 중 강한 활성을 나타내는 분획 2(10.5g)를 세파덱스 LH-20(Sephadex LH-20) 레진에 로딩한 후 메탄올로 용출하여 화합물 4(리코칼콘 A) 6.2g을 얻을 수 있었다. 분획 3(4.5g)을 MeOH-H_2O 혼합용매로 사용하여 5:5 부터 10:0까지 순차적으로 증가시키는 조건을 사용하여 역상(RP-18) 컬럼크로마토그래피를 실시하여 다시 8개의 소분획을 얻었다(fr.3.1-3.8). 소분획 F3.2(120mg)를 MeOH-H_2O(0-55min: 62% MeOH, 60min: 100% MeOH)을 사용하여 HPLC [YMC Pak C_{18} column 20×150mm; 4㎛ 입자 크기 3mℓ/min; UV detection: 254nm]를 실시하여 화합물 2(에치나틴, 20mg, t_R = 25.0min), 화합물 6(5-프레닐부테인, 1.5 mg, t_R = 50.0min)을 얻었다. 소분획 F3.3(250mg)을 MeOH-H_2O (0-55min: 65% MeOH, 60min: 100% MeOH)을 사용하여 소분획 F3.2를 분리한 동일조건의 HPLC를 실시하여 화합물 3(리코칼콘 D, 17mg, t_R = 42.0min), 화합물 1 (리코칼콘 F, 5.0 mg, t_R = 50.0min)을 얻었으며, 소분획 F3.4(250mg)으로부터 사용한 메탄올의 용매를 68%까지 증가시켜 화합물 5 (리코아그로칼콘 A, 2.0mg, t_R = 48.0 min)를 얻었다. 최종적으로 소분획 F3.6의 일부를 취하여 MeOH-H_2O을 86% 사용한 조건에서 화합물 7(칸조놀 C, 4.0mg, t_R = 60.0min)을 얻었다 (도 1 참조).

[0039] <실시예 2: 분리된 화합물의 구조 분석>

[0040] 상기 실시예 1에서 감초로부터 분리된 7종 화합물의 구조를 분석하였다. 화합물의 화학적 구조를 ESI 질량분석기(Electrospray Ionization mass spectrometer)을 사용하여 얻은 분자량 및 핵자기 공명 분석의 ^{1}H 및 ^{13}C-NMR 분석 결과를 토대로 화합물의 구조를 분석하였다. 신규 화합물 1의 화합물 구조는 추가적인 핵자기공명 (NMR) 분석을 통하여 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HMQC (^{1}H-detected heteronuclear multiple-quantum coherence), HMBC (heteronuclear multiple-bond coherence), DEPT (distortionless enhancement by polarization) 스펙트럼을 얻고 분자 구조를 결정하였다.

[0041] 그 결과, 구조 결정된 화합물은 상기 화학식 1에서 보여준 구조를 가졌으며, 분리된 신규 화합물의 화학적 특성 및 신규 화합물 1을 포함한 화합물 2 - 7번 화합물의 ^{1}H, ^{13}C-NMR 결과값을 정리하여 하기에 표시하였다.

[0042] (화학적 특성)

[0043] 리코칼콘 F (Licochalcone F, 화합물 1): Yellow needle; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 260 (3.76), 380 (4.09); IR (KBr) V_{max} 3420, 2965, 1601, 1557, 1445, 1285, 1166cm^{-1} ; EI MS *m/z* (rel. int.): 354 ([M]$^{+}$, 27), 349 (10), 324 (23), 323 (100), 137 (42); HREI MS *m/z* 354.1465 [M]$^{+}$ (Calcd. for $C_{21}H_{22}O_5$, 354.1467); ^{1}H-NMR (CD_3COCD_3, 500 MHz) δ 7.98 (1H, d, *J* = 15.5Hz, H-β), 7.64 (1H, d, *J* = 15.5Hz, H-α), 7.60 (1H,

d, J = 8.0Hz, H-6'), 7.58 (1H, s, H-6), 7.56 (1H, d, J = 8.0Hz, H-5'), 6.94 (1H, d, J = 2.1Hz, H-3'), 6.58 (1H, s, H-3), 6.30 (1H, dd, J = 17.0 and 11.0Hz, H-2"), 5.04 (1H, dd, J = 17.0 and 1.5Hz, H-3"), 4.99 (1H, dd, J = 11.0 and 1.5Hz, H-3"), 3.87 (3H, s, OCH_3), 1.51 (6H, s, H-4", H-5"); ^{13}C-NMR (CD_3COCD_3, 125 MHz) δ 188.5 (C=O), 159.9 (C-2', s), 159.8 (C-2, s), 150.5 (C-4, s), 148.7 (C-2", d), 145.8 (C-4', s), 139.8 (C-β, d), 132.5 (C-1', s), 129.4 (C-1, C-6' d), 127.6 (C-5, s), 122.7 (C-6, d), 119.7 (C-α, d), 116.1 (C-5', d), 115.6 (C-3', d), 110.9 (C-3", t), 101.1 (C-3, d), 56.0 (OCH_3), 40.8 (C-1", s), 27.6 (C-4", C-5", q).

[0044] 에치나틴 (Echinantin, 화합물 2): Yellow needle; UV λ_{max} (MeOH): 236, 312, 369nm; EI-MS m/z: 270 $[M]^+$ (21), 239 (100), 121 (20); ^{1}H-NMR (CD_3COCD_3, 500 MHz) δ 8.03 (1H, d, J = 15.5Hz, H-β), 8.02 (2H, d, J = 8.5Hz, H-2', H-6'), 7.69 (1H, d, J = 8.0Hz, H-6), 7.68 (1H, d, J = 15.5Hz, H-α), 6.94 (2H, d, J = 8.5Hz, H-3', H-5'), 6.55 (1H, s, H-3), 6.51 (1H, d, J = 8.0Hz, H-5), 3.95 (3H, s, OCH_3); ^{13}C-NMR (CD_3COCD_3, 125 MHz) δ 188.5 (C=O), 162.3 (C-4', s), 162.1 (C-4, s), 161.4 (C-2, s), 139.3 (C-β, d), 131.8 (C-1', s), 131.6 (C-2', C-6', d), 131.2 (C-6, d), 119.6 (C-α, d), 116.8 (C-1, s), 116.7 (C-3', C-5', d), 108.9 (C-5, d), 99.9 (C-3, d), 56.0 (OCH_3).

[0045] 리코칼콘 D (Licochalcone D, 화합물 3): Yellow needle; UV λ_{max} (MeOH): 254, 359nm; EI-MS m/z: 354 $[M]^+$ (9), 323 (100), 267 (12); ^{1}H-NMR (CD_3COCD_3, 500 MHz) δ 7.95 (1H, d, J = 16.0Hz, β), 7.93 (1H, brs, H-2'), 7.88 (1H, d, J = 8.5Hz, H-6'), 7.70 (1H, d, J = 16.0Hz, H-α), 7.28 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6), 6.96 (1H, d, J = 8.5Hz, H-5'), 6.71 (1H, d, J = 8.0Hz, H-5), 5.38 (1H, m, H-2"), 3.86 (3H, s, OCH_3), 3.39 (2H, d, J = 7.5Hz, H-1"), 1.74 (3H, s, H-4"), 1.73 (3H, s, H-5"); ^{13}C-NMR (CD_3COCD_3, 125 MHz) δ 188.6 (C=O), 160.2 (C-4', s), 149.6 (C-4, s), 149.2 (C-2, s), 139.2 (C-3, s), 139.1 (C-β, d), 133.1 (C-1', s), 131.7 (C-6', d), 131.4 (C-3", s), 129.2 (C-3', s), 129.1 (C-2', d), 123.2 (C-2", d), 121.5 (C-1, s), 120.9 (C-α, d), 120.1 (C-6, d), 115.6 (C-5', d), 112.5 (C-5, d), 61.7 (OCH_3), 25.9 (C-1", t), 25.9 (C-5", q), 17.9 (C-4", q).

[0046] 리코칼콘 A (Licochalcone A, 화합물 4): Yellow powder; UV λ_{max} (MeOH): 378, 308nm; EI-MS m/z: 339 $[M+1]^+$, 323, 307, 216, 192, 121; ^{1}H-NMR (CD_3COCD_3, 500 MHz) δ 8.03 (1H, d, J = 15.5Hz, H-β), 8.01 (2H, d, J = 8.5Hz, H-2', H-6'), 7.68 (1H, d, J = 15.5Hz, H-α), 7.63 (1H, s, H-6), 6.95 (2H, d, J = 8.5Hz, H-3', H-5'), 6.58 (1H, s, H-3), 6.30 (1H, dd, J = 17.5 and 11.0Hz, H-2"), 5.04 (1H, dd, J = 17.5 and 1.5Hz, H-3"), 4.98 (1H, dd, J = 11.0 and 1.5Hz, H-3"), 3.86 (3H, s, OCH_3), 1.51 (6H, s, H-4", H-5"); ^{13}C-NMR (CD_3COCD_3, 125 MHz) δ 188.5 (C=O), 162.2 (C-4', s), 160.0 (C-4, s), 159.8 (C-2, s), 148.7 (C-2", d), 140.1 (C-β, d), 131.8 (C-1', s), 131.6 (C-2', C-6', d), 129.3 (C-6, d), 127.6 (C-5', s), 119.6 (C-α, d), 116.4 (C-3', C-5', d), 115.9 (C-1, s)α, 110.1 (C-3", t), 101.1 (C-3, d), 56.0 (OCH_3), 40.7 (C-1", s), 27.5 (C-4", C-5", q).

[0047] 리코아그로칼콘 A (Licoagrochalcone A, 화합물 5): Yellow powder; UV λ_{max} (MeOH): 298, 382nm; EI-MS m/z: 324 $[M]^+$ (73), 323 (31), 188 (32), 175 (100), 137 (87), 133 (51); ^{1}H-NMR (CD_3COCD_3, 500 MHz) δ 8.10 (1H, d, J = 8.5Hz, H-6'), 7.79 (1H, d, J = 15.5Hz, H-β), 7.73 (1H, d, J = 15.5Hz, H-α), 7.62 (1H, brs, H-2), 7.58 (1H, d, J = 8.5Hz, H-6), 6.94 (1H, d, J = 8.5Hz, H-5), 6.48 (1H, d, J = 8.5Hz, H-5'), 6.37 (1H, brs, H-3'), 5.37 (1H, m, H-2"), 3.36 (2H, d, J = 7.2Hz, H-1"), 1.73 (6H, s, H-4", H-5"); ^{13}C-NMR (CD_3COCD_3, 125 MHz) δ 192.8 (C=O), 167.3 (C-2', s), 165.6 (C-4', s), 158.7 (C-4, s), 145.6 (C-β, d), 133.3 (C-6', d), 132.9 (C-3", s), 131.9 (C-2, d), 129.7 (C-3, s), 129.3 (C-6, d), 127.7 (C-1, s),

123.4 (C-2", d), 118.1 (C-α, d), 116.3 (C-5, d), 114.5 (C-1', s), 108.7 (C-5', d), 103.8 (C-3', d), 29.1 (C-1", t), 25.9 (C-5", q), 17.9 (C-4", q).

[0048] 5-프레닐부테인 (5-Prenylbutein, 화합물 6): Amorphous powder; UV λ_{max} (MeOH): 375nm; HRMS *m/z* 341.1318 $[M + 1]^+$ (calcd for $C_{20}H_{21}O_5$ 341.1389); ^{1}H-NMR (CD_3COCD_3, 500 MHz) δ 13.99 (s, OH-2'), 7.98 (1H, d, *J* = 8.0Hz, H-6'), 7.77 (1H, d, *J* = 15.0Hz, H-β), 7.68 (1H, d, *J* = 15.0Hz, H-α), 7.35 (1H, d, *J* = 2.1Hz, H-2), 7.22 (1H, d, *J* = 2.1Hz, H-6), 6.91 (1H, d, *J* = 8.5Hz, H-5'), 6.53 (1H, brs, H-3'), 5.27 (1H, m, H-2"), 3.37 (2H, d, *J* = 7.0Hz, H-1"), 1.78 (3H, s, H-4"), 1.64 (3H, s, H-5"); ^{13}C-NMR (CD_3COCD_3, 125 MHz) δ 193.1 (C=O), 164.8 (C-2', s), 162.6 (C-4', s), 149.1 (C-5, s), 146.4 (C-4, s), 145.4 (C-β, d), 131.6 (C-6', d), 130.4 (C-3", s), 128.4 (C-3, d), 123.5 (C-2, d), 123.4 (C-2", d), 121.0 (C-1, s), 118.7 (C-α, d), 116.4 (C-1', s), 116.1 (C-5', d), 116.0 (C-3', d), 114.5 (C-6, d), 25.9 (C-1", t), 22.3 (C-5", q), 18.6 (C-4", q).

[0049] 칸조놀 C (Kanzonol C, 화합물 7): Yellow oil; UV λ_{max} (MeOH): 203, 340, 371, 375nm; EI-MS m/z: 393 $[M + 1]^+$ (15), 392 $[M]^+$ (49), 349 (50), 337 (16), 307 (20), 293 (12), 281 (6), 205 (25), 187 (25); ^{1}H-NMR (CD_3COCD_3, 500 MHz) δ 14.02 (s, OH-2'), 7.93 (1H, d, *J* = 8.5Hz, H-6'), 7.82 (1H, d, *J* = 15.5Hz, H-β), 7.72 (1H, d, *J* = 15.5Hz, H-α), 7.61 (1H, brs, H-2), 7.56 (1H, d, *J* = 8.0Hz, H-6), 6.94 (1H, d, *J* = 8.5Hz, H-5'), 6.53 (1H, d, *J* = 8.0Hz, H-5), 5.36 (1H, m, H-2"), 5.28 (1H, m, H-2'''), 3.36 (4H, d, *J* = 7.5Hz, H-1", H-1'''), 1.78 (3H, s, H-4"), 1.74 (3H, s, H-4'''), 1.72 (3H, s, H-5'''), 1.64 (3H, s, H-5"); ^{13}C-NMR (CD_3COCD_3, 125 MHz) δ 193.1 (C=O), 164.8 (C-2', s), 162.6 (C-4', s), 158.6 (C-4, s), 145.4 (C-β, d), 132.9 (C-6', d), 131.8 (C-3", C- 3'''s), 130.3 (C-2, d), 129.7 (C-3, s), 129.5 (C-3', s), 129.2 (C-6, d), 127.8 (C-1, s), 123.4 (C-2", d), 123.3 (C-2''', d), 118.3 (C-α d), 116.3 (C-5, d), 114.5 (C-1', s), 108.0 (C-5', d), 25.9 (C-1", C-1''' t), 22.4 (C-5", C-5''' q), 17.9 (C-4''' q), 17.8 (C-4", q).

[0050] <실시예 3: DDAH 프로모터를 이용한 활성 측정>

[0051] 실시예 1 및 2에서 분석된 화합물 1~7을 이용하여 DDAH의 활성을 측정하기 위해 DDAH 프로모터(promoter)-루시퍼라제(luciferase) 시스템을 이용하여 확인하였다. 프로모터는 전사를 조절할 대상이 되는 유전자의 유전정보를 지니고 있는 DNA 염기서열 앞 부분에 위치하고, 전사조절인자(transcription factor)가 프로모터 부분에 결합하여 RNA 합성을 하기 위해 RNA 중합효소를 가져온다. 따라서 프로모터의 염기서열 뒤에 위치한 루시퍼라제 유전자는 역시 프로모터가 활성이 많이 될수록 그 발현양이 많아지게 되어 프로모터의 활성을 확인할 수 있다. 또한 DDAH가 미토콘드리아(mitochondia) 단백질이기에 미토콘드리아가 상대적으로 많이 분포하는 마우스 유래의 내피세포종(endothelioma) bEnd.3 세포를 선택하여 프로모터의 활성을 측정하였다.

[0052] 먼저 bEnd.3 세포를 0.25%의 트립신(trypsin) 처리하여 모은 후, 상층액을 제거한 뒤 우혈청이 제거된 DMEM 배지로 현탁하였다. 그리고 우혈청이 포함되지 않는 DMEM 100㎕에 3㎕의 리포펙타민(lipopectAMINE, life Technologies, Inc)을 세포 현탁액에 점적한 후 천천히 섞어 15분간 실온에 방치하고, 50ng의 pDDAH II-Luc 또는 mpDDAH-Luc(루시퍼라제 유전자를 가진 플라즈미드), 0.1ug의 pCMV-b-galactosidase[트랜스펙션(transfection, DNA를 동물 세포에 유입하는 방법)의 효율을 일정하게 맞추기 위한 표준물질로 β-갈락토시다제(β-galactosidase) 유전자를 가진 플라즈미드(plasmid)], 0.1㎍의 DDAH 발현 벡터 또는 대조군으로 쓰일 벡터를 넣은 미세 원침 튜브에 30초에 걸쳐 천천히 점적하면서 혼합하여 실온에서 다시 15분간 방치하였다. 리포펙타민과 DNA-플라즈미드의 혼합액과 b-End.3 세포를 천천히 섞어 현탁액 상태로 20분간 실온에서 배양한 후 60mm 배양용기에 분주하고 CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였고, 다음날 각각의 화합물을 각각 1㎍/㎖를 첨가한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. bEnd.3 세포는 PBS로 2회 세척하고 각각의 배양용기에 500㎕의 추출용액을 가하여 세포를 파괴한 뒤 14,000rpm에서 5분간 원심분리 하였고, 얻어진 상층액을 루시퍼라제와 β-갈락토시다제의 활성 측정에 사용하였다. 루시퍼라제의 활성은 100㎕의 세포에서 추출된 상층액과 100㎕의 20nM D-루시페린(루시퍼라제를 이용해 발색되는 기질)과 300㎕의 반응액 (20mM glycylglycin, 12.5mM MgSO4, 3mM EGTA, 15mM potassium phosphate, 1mM DTT, 1mM ATP)을 사용하여 루미노미터(luminometor, Berthold Clinolumat)로 측정하였다. 유전자 주입 효율을 보정하기 위하여 β-갈락토시다제의 활성을 측정하여 루시퍼라제의 활성을 보정하였

다. β-갈락토시다제의 활성은 30㎕의 세포추출액과 66㎕의 ONPT(4mg/㎖), 204㎕의 반응액(0.1M sodium phosphate, 1mM $MgCl_2$, 45mM β-mercaptoethanol, pH 7.5)을 37℃ 항온조에서 반응시킨 후 분광광도계(spectrophotometer)로 흡광도를 측정하였다.

[0053] 도 2는 칼콘계 화합물1~7의 DDAH의 활성을 확인한 결과이다. 도 2에 도시된 바와 같이 감초로부터 얻은 칼콘계 화합물 1~7의 DDAH 프로모터 활성화 작용을 측정한 결과 화합물은 최종농도 5㎍/㎖의 농도에서 DDAH의 프로모터의 활성을 평균 2배 이상 증가시킴을 확인하였다.

[0054] <실시예 4: 감초로부터 분리한 리코칼콘 A의 베타세포 예방 효과 측정>

[0055] 다음으로는 감초 유래의 화합물이 베타세포 사멸을 예방하는 효과가 있는지 확인하기 위해 MTT 어세이를 실시하였다. 상기 화합물은 실시예 1과 실시예 2의 결과를 통해 감초 유래의 화합물 중 DDAH 활성이 좋고 감초 추출물 중에 대표적으로 많이 존재하는 리코칼콘 A를 이용하여 수행하였다.

[0056] 먼저 인슐린 분비 세포주인 HIT-T15 세포를 48시간 배양한 후 세포 사멸을 유도하는 2-데옥시글루코스(2-deoxyglucose, 2-DG) 10mM을 처리하였으며, 리코칼콘 A(10㎍/㎖)는 2-데옥시글루코스 처리 1시간 전에 전처리하여 반응시켰다. PBS 완충액에 녹인 MTT(5mg/㎖) 용액을 세포에 첨가하여 4시간 동안 반응 후, 상등액을 제거하고 DMSO 250㎕ 넣어 ELISA 리더(ELISA reader)로 흡광도를 확인하였다.

[0057] 도 3은 2-데옥시글루코스를 이용하여 베타세포 사멸을 유도한 결과이다. 도 3에 도시된 바와 같이 2-데옥시글루코스를 처리한 군에서는 베타세포가 대략 50% 정도 사멸되었으나 리코칼콘 A와 2-데옥시글루코스를 함께 처리한 군에서는 베타세포가 거의 사멸되지 않는 결과를 확인할 수 있다.

[0058] <실시예 5: 리코칼콘 A의 당뇨병성 신증 동물 모델에서 단백뇨 감소 효과 측정>

[0059] 생후 8주된 200~250g의 수컷 SD 랫트(rat)의 한쪽 신장을 절제한 후 일주일 뒤 당뇨병을 유도하는 물질로 알려진 스트렙토조토신(streptozotocin) 60mg/kg을 복강 내로 1회 주사하였다. 1주 이내에 꼬리에서 채취한 혈당이 300mg/dl 이상일 때 당뇨병이 유도된 것으로 정의하였고 당뇨가 유도된 랫트는 리코칼콘 A(25mg/kg/day)를 8주간 경구 투여하였다. 대조군으로 이용된 비치료군은 약물을 첨가하지 않은 정상 먹이를 투여하였다. 매주 혈당 및 소변 내 케톤 검사를 시행하여 필요시 인슐린을 2~3U/kg로 피하 주사하였고 24시간 동안 소변을 수집하여 알부민뇨 수치를 측정하였다.

[0060] 도 4는 24시간 수집된 소변의 알부민뇨 수치를 보여주는 결과이다. 도 4에 도시된 바와 같이 당뇨병 유도 랫트에서 증가된 알부민뇨 발생은 스트렙토조토신만 처리한 군보다 리코칼콘 A를 함께 투여한 군이 대조군과 비슷한 수치로 현저하게 줄어드는 효과를 보여 주었다.

[0061] <실시예 6: 독성실험>

[0062] 6-1. 급성독성

[0063] 다음으로는 감초로부터 추출된 리코칼콘 A를 단기간에 과량을 섭취하였을 시 동물 체내에 미치는 급성독성(24시간 이내)을 조사하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 20 마리를 대조군은 10 마리, 실험군은 10 마리씩 배정하였다. 대조군에는 화합물이 포함되지 않는 용매(PEG-400/tween-80/EtOH, 8/1/1, v/v/v)만을 투여하고, 실험군은 감초으로부터 추출된 리코칼콘 A를 상기 실시예 5에서 사용된 25mg/kg의 40배(1.0g/kg) 농도로 경구 투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 1.0g/kg 농도의 리코칼콘 A를 투여한 실험군 모두 생존하였고 급성독성 효과는 나타나지 않았다.

[0064] 6-2. 장기 및 조직독성

[0065] 감초로부터 추출된 리코칼콘 A를 25mg/kg의 농도로 8주 동안 투여하여 OLETF 랫트(Rat)를 대상으로 실험하였다. 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 리코칼콘 A를 투여한 실험군과 용매만을 투여한 대조군의 동물들로부터 4주 후 혈액을 채취하여 GOT (glutamate-oxalate-transferase), GPT (glutamate-pyruvate-transferase), 크레아틴 카이네이즈 (creatin kinase) 및 크레아티닌 (creatinine)등의 혈액 내 농도를 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GOT 및 GPT, 신장독성의 지표인 크레아티닌과 근육독성의 지표인 크레아틴 카이네이즈 등의 경우에는 대조군과 비교하여 리코칼콘 A의 실험군도 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 심장, 폐, 췌장, 부신, 간, 신장 및 근육 등을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으나 특이한 이상이 나타났거나 독성 효과가 유도되었다는 것은 확인할 수 없었다.

[0066] <제제예 1: 약학적 제제예>

[0067] 1-1. 정제의 제조

[0068] 본 발명에 따른 감초 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0069] 1-2. 주사액제의 제조

[0070] 본 발명에 따른 감초 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0071] <제제예 2 : 식품 제조예>

[0072] 2-1. 조리용 양념의 제조

[0073] 본 발명에 따른 감초 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 각각 0.2~10 중량부로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0074] 2-2. 밀가루 식품의 제조

[0075] 본 발명에 따른 감초 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 각각 0.1~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0076] 2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0077] 본 발명에 따른 감초 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 각각 0.1~1.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0078] 2-4. 유제품(dairy products)의 제조

[0079] 본 발명에 따른 감초 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 각각 0.1~1.0 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0080] <제제예 3 : 음료 제조예>

[0081] 3-1. 야채쥬스 제조

[0082] 본 발명에 따른 감초 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 0.5g을 토마토 또는 당근 쥬스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채쥬스를 제조하였다.

[0083] 3-2. 과일쥬스 제조

[0084] 본 발명에 따른 감초 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물 0.1g을 사과 또는 포도 쥬스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일쥬스를 제조하였다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 감초를 에탄올로 추출한 추출물로부터 HPLC 분석을 한 스펙트럼을 나타낸 것이다.

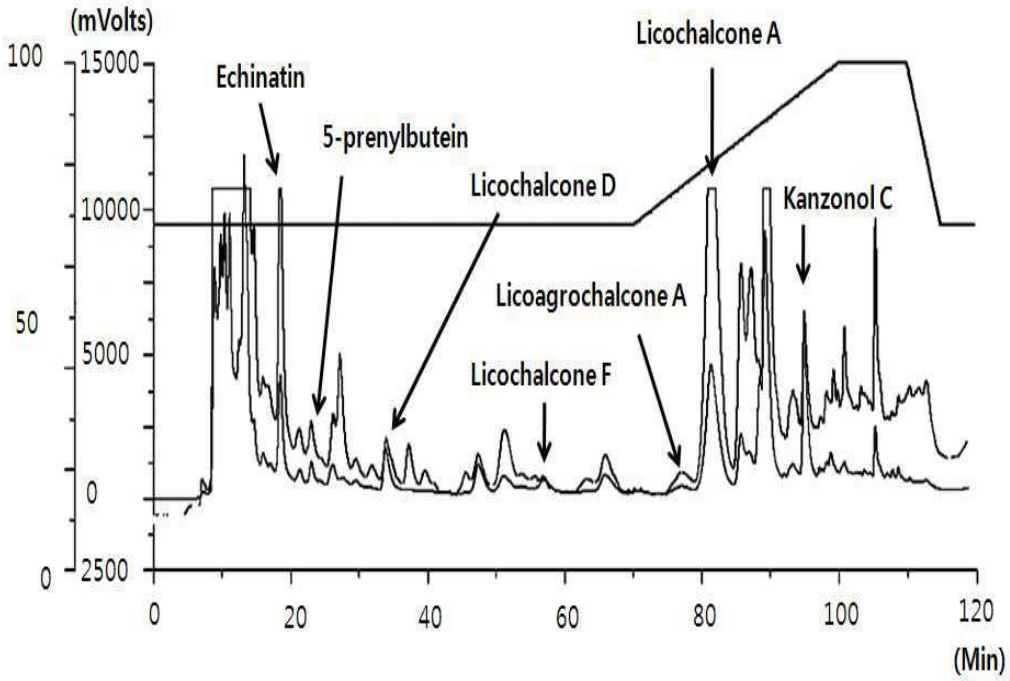
[0086] 도 2는 감초로보터 분리한 화합물의 DDAH 프로모터의 활성을 측정한 것이다.

[0087] 도 3은 2-데옥시글루코스와 리코칼콘 A를 HIT-T15 세포에 처리한 것이다.

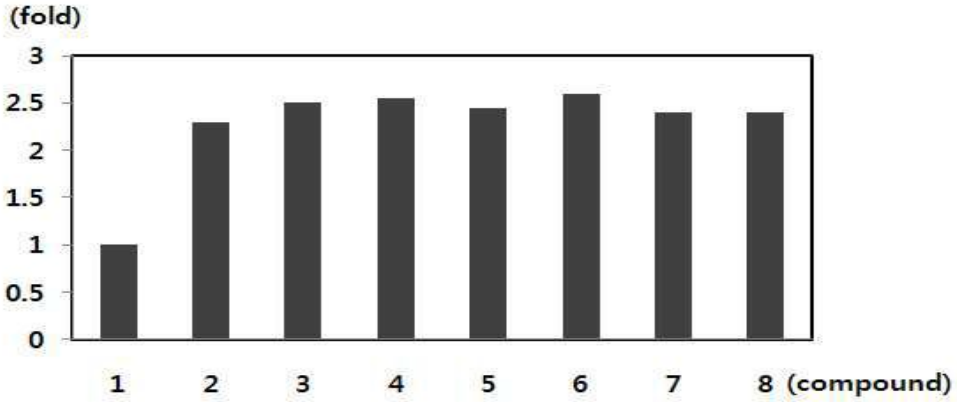
[0088] 도 4는 리코칼콘 A를 당뇨병성 신증 동물 모델에 8주간 25㎎/㎏ 농도로 투여 후 측정한 24시간 후의 알부민뇨의 수치를 나타낸 것이다.

도면

도면1



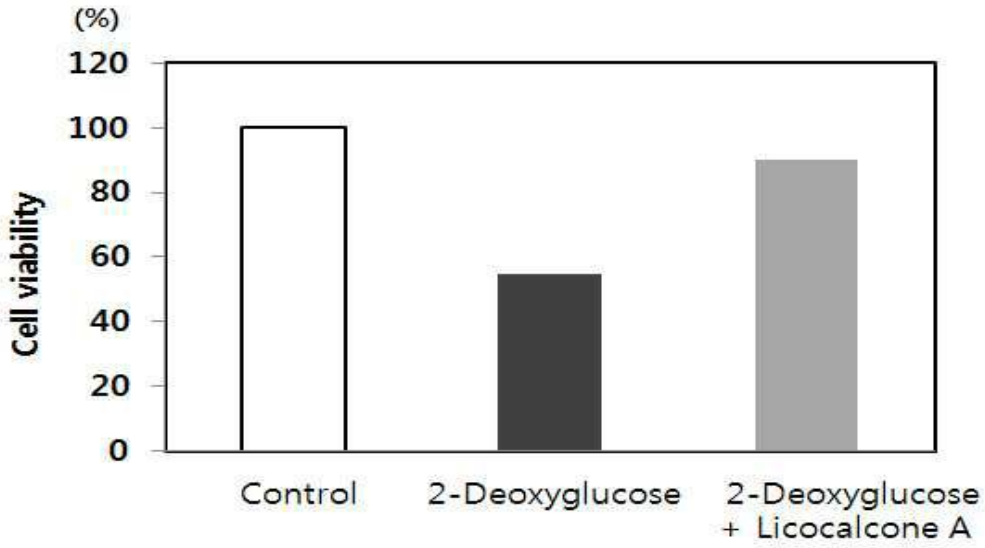
도면2



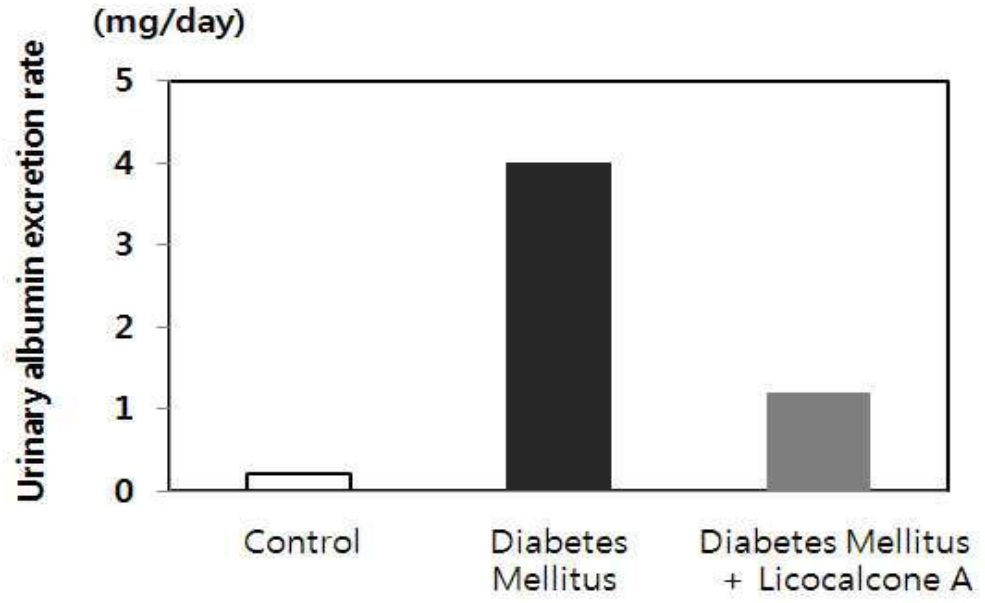
Compound

1. Control(DMSO)
2. Kanzonol C
3. Licoagrochalcone A
4. Licochalcone F
5. Licochalcone A
6. Echinatin
7. 5-Prenylbutein
8. Licochalcone D

도면3


(%)
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability
Control
2-Deoxyglucose
2-Deoxyglucose
+ Licocalcone A

도면4


(mg/day)
5
4
3
2
1
0
Urinary albumin excretion rate
Control
Diabetes
Mellitus
Diabetes Mellitus
+ Licocalcone A