



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0078963
(43) 공개일자 2008년08월29일

(51) Int. Cl.

A61K 36/258 (2006.01) A61K 36/37 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0018857

(22) 출원일자 2007년02월26일

심사청구일자 2007년02월26일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

정성현

서울 동대문구 이문2동 264-465번지 삼익단독 21동

한기철

서울 노원구 하계2동 시영아파트 508동 303호

(74) 대리인

김정대

전체 청구항 수 : 총 6 항

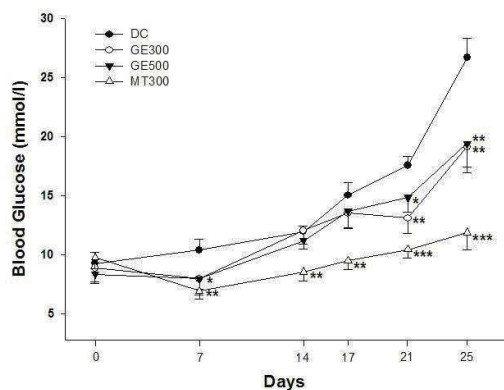
(54) 인삼 추출물 및 화살나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼(*Ginseng Radix*) 추출물 및 화살나무(*Euonymus alatus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 및 이로 인한 합병증의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 기존의 당뇨치료제와는 달리 여러 가지 기전에 의해 효능을 나타내므로, 인슐린 분비 장애와 인슐린 저항성을 동시에 지니고 있는 제 2형 당뇨 환자에 특히 유용하며, 췌장 베타세포의 기능부전, 고지혈증 등에 기인한 당뇨 합병증의 예방 및 치료에도 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼(*Ginseng Radix*) 추출물 및 화살나무(*Euonymus alatus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 2

베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼(*Ginseng Radix*) 추출물 및 화살나무(*Euonymus alatus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병으로 인한 합병증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인삼 추출물 및 상기 화살나무 추출물은 50% 에탄올을 용매로 사용한 추출물인 약학 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인삼 추출물 및 상기 화살나무 추출물의 중량 조성비는 1~10 : 1~5인 약학 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인삼 추출물 및 상기 화살나무 추출물은 조성물 총 중량에 대해 0.5~50 중량%인 약학 조성물.

청구항 6

베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼(*Ginseng Radix*) 추출물 및 화살나무(*Euonymus alatus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 및 이로 인한 합병증의 예방 또는 치료용 기능성 식품 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <12> 본 발명은 베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼(*Ginseng Radix*) 추출물 및 화살나무(*Euonymus alatus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 및/또는 이로 인한 합병증의 예방 및/또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- <13> 당뇨병은 현대인의 생활 습관 변화와 더불어 증가 추세에 있는 생활 습관병이다. 세계보건기구에 의하면 2030년에는 전 세계적으로 3억 명 이상의 당뇨병환자가 발생할 것으로 추산하고 있어 이에 대한 대처가 시급한 상황이다. 당뇨병환자의 90% 이상을 차지하는 제 2형 당뇨병은 고혈당을 특징으로 하는 대사 질환으로 유전적, 대사적, 환경적인 요인에 의한 췌장 베타 세포의 인슐린 분비 저하 또는 말초 조직에서의 인슐린 저항성 증가로 인해 발생된다. 만성적 고혈당은 췌장 베타 세포에 손상을 일으켜 세포 사멸을 야기하므로 (glucotoxicity) 제 2형 당뇨병의 치료를 위해서는 효과적인 혈당의 조절이 가장 중요하다고 할 수 있다.
- <14> 현재 제 2형 당뇨병을 치료하는 약제로는 알파글루코시데이즈 저해제인 아카보즈, 인슐린분비 촉진제인 설폰닐우레아, 레파글리나이드, 나테글리나이드, 그리고 인슐린 저항성 개선제인 비구아니드, 글리타존 계열의 약이 있다. 하지만 이들은 복부팽만감, 설사, 저혈당, 체중증가 등 그 부작용이 만만치 않아 부작용은 적고 약효는 우수한 경구용 혈당강하제의 개발이 요구되고 있다.
- <15> 한편, 인삼(*Ginseng Radix*)에서 생리 활성 물질인 진세노사이드 중 디올(diol)계 진세노사이드는 인슐린 분비 촉진 작용, 트리올(triol)계 진세노사이드는 인슐린 저항성 개선 작용이 있다고 보고되어 있으며, 그 중 디올계 진세노사이드의 장내 대사체인 IH-901(compound K)의 경우 본 발명자의 선행 연구 결과 인슐린의 분비 촉진 작용이 탁월한 것으로 확인된 바 있다. 그리고 화살나무(*Euonymus alatus*)는 유효 성분인 3-O-메틸우르솔산(3-O-

methylursolic acid)의 인슐린 분비 촉진 활성 및 50% 에탄올 추출물의 인슐린 저항성 개선 활성이 본 발명자의 선행 연구를 통해 확인된 바 있다(J. Ethnopharmacol. 102, 326-335, 2005).

- <16> 상기와 같은 사실을 기초로 본 발명자들은 부작용이 적으면서도 우수한 항당뇨 활성 및 기전을 나타내는 제제를 개발하고자 연구한 결과, 인슐린 분비 촉진 작용이 우수한 IH-901을 다량 함유하는 인삼 추출물과 인슐린 저항성 개선 작용을 지닌 화살나무 추출물을 혼합한 조성물이 종래의 제제에 비해 우수한 효능을 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <17> 따라서 본 발명의 목적은 우수한 효능을 나타내는 당뇨병 및 이로 인한 합병증의 예방 및 치료를 위한 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <18> 본 발명은 베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼(*Ginseng Radix*) 추출물 및 화살나무(*Euonymus alatus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 및 이로 인한 합병증의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- <19> 또한 본 발명은 베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼(*Ginseng Radix*) 추출물 및 화살나무(*Euonymus alatus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 및 이로 인한 합병증의 예방 및 치료용 식이요법에 사용할 수 있는 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- <20> 본 발명의 조성물은 우수한 혈당 강하 작용을 지니고 있을 뿐만 아니라 인슐린 저항성 개선 효과, 혈중 지질 농도 개선 효과 등을 나타내므로, 당뇨병 및 이로 인한 합병증의 예방 및 치료를 위한 약제, 식품 또는 음료로서 유용하게 이용될 수 있다.
- <21> 상기 베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼 추출물에 있어서, 효소처리한 인삼에 대해 베타-글루코시다아제 효소를 첨가하여 하기 실험에 1에서 후술하는 인삼의 생리활성 성분 IH-901, Rg2 및 Rg3을 얻는데 충분한 온도, pH 및 시간으로 접촉시키는 것을 의미한다. 한편 인삼 추출물이라 함은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 극성용매로부터의 추출물이며, 바람직하게는 50% 에탄올로부터의 추출물을 의미한다.
- <22> 상기 화살나무 추출물에 있어서, 화살나무 추출물이라 함은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 극성용매로부터의 추출물이며, 바람직하게는 50% 에탄올로부터의 추출물을 의미한다.
- <23> 상기 인삼 추출물 및 상기 화살나무 추출물을 얻기 위하여 당업계에서 통상 사용되는 추출방법을 사용하며, 예를 들면 생약 부피의 1~15배, 바람직하게는 5~10배의 용매로 20~100℃, 바람직하게는 70~100℃ 추출온도에서 1시간~2일, 바람직하게는 2시간~1일 동안 환류 추출, 초음파 추출 등의 추출방법으로 얻을 수 있다.
- <24> 본 발명의 당뇨병 예방 및 치료용 조성물에 있어서, 상기 인삼 추출물 및 상기 화살나무 추출물의 중량 조성비는, 이에 한정되는 것은 아니나 1~10 : 1~5인 것이 바람직하다.
- <25> 본 발명의 당뇨병 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 인삼 추출물과 상기 화살나무 추출물을 혼합한 복합제를 0.5~50 중량%로 포함한다.
- <26> 본 발명의 당뇨병 예방 및 치료용 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 당업자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 제형화될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물은 실제 투여시에 경구 또는 비경구용의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 해당되며, 이러한 고형제제에는 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 슈크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등이 포함될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되며, 이러한 액상제제에는 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제로는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 등이 해당되며, 비수성용제, 현탁제에는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- <27> 본 발명의 당뇨병 예방 및 치료용 조성물에 있어서, 상기 인삼 추출물 및 상기 화살나무 추출물을 혼합한 복합

제의 특정 환자에 대한 유효 투여량의 범위는 사용 목적, 다른 제제와의 병용 투여 여부, 환자의 연령, 체중, 성별, 일반 건강 상태, 식이, 투여 시간, 투여 경로, 사용 기간 등을 비롯한 여러 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하나, 일반적으로 1 내지 500 mg/kg 으로 투여할 수 있으며 1일 1~3회 투여하는 것이 바람직하다. 당업자라면, 임의의 특정 대상체에 대해, 개별 대상체의 필요 및 조성물을 투여하거나 조성물의 투여를 감독하는 사람의 전문가적 판단에 따라 특정 투여법이 시간에 따라 조정되어야 하고, 본원에서 제시한 투여량의 범위는 단지 예시일 뿐이고 청구된 조성물의 범위 또는 실행 범위를 제한하려는 것이 아님을 이해할 것이다.

<28> 또한 본 발명은 베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼 추출물 및 화살나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 기능성 식품 조성물을 제공한다. 이러한 식품으로는 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있으며, 상기 식품에는 식품업계에서 통상적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제가 포함될 수 있다.

<29> 이 때 식품 중의 상기 인삼 추출물과 상기 화살나무 추출물을 혼합한 복합제의 양은 식품 총 중량에 대하여 0.5 내지 50중량%로 첨가할 수 있으며 음료의 경우 100ml 당 0.5 내지 10g의 비율로 첨가할 수 있다. 본 발명의 건강 기능성 식품 조성물은 필수 성분으로서 상기 효소처리한 인삼 추출물 및 상기 화살나무 추출물을 함유하는 것 외에는 다른 첨가 성분에 특별한 제한이 없으며 통상의 식품에 사용되는 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 함유할 수 있다.

<30> 이하에서는 본 발명을 실시예 및 실험예를 들어 구체적으로 서술하나, 이는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명이 이로써 제한되는 것은 아니다.

<31> 실시예 : 본 발명의 조성물의 제조 방법

<32> 베타-글루코시다아제 효소로 처리한 인삼 추출물은 일화 중앙 연구소로부터 공급받아 동결 건조하여 사용하였다. 화살나무 추출물은 화살나무를 적당한 크기로 잘라 50% 에탄올을 시료무게의 10배 분량으로 넣고 3 시간 동안 2번을 끓인 다음 여과하여 감압증발을 시킨 후 동결 건조하여 사용하였다. 각각의 추출물을 1 대 1의 비율로 혼합하여 최종적으로 조성물을 제조하였다.

<33> 실험예 1 : 효소처리한 인삼 추출물의 진세노사이드 분석

<34> 인삼 추출물의 HPLC 분석조건은 다음과 같다: 컬럼(column), Previal Carbohydrate ES 5U (250 ⅓ 4.6 mm); 펌프, Alltech pump 627; 검출기, ELSD 2000ES; 이동상 A(mobile phase A): 아세토니트릴(acetonitrile) : 물(water) : IPA = 80 : 5 : 5, B : 아세토니트릴 : 물 : IPA = 67 : 21 : 12; 구배(gradient), 0-65분(min), %B = 10, 85, 85, 75, 90, 100, 25, 10, 10%; 유속(flow rate), 0.8 ml/min; 주입량(injection volume), 20μl

<35> HPLC 분석 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1A, 1B는 표준 진세노사이드 12개, 도 1C, 1D는 인삼 추출물, 도 1E, 1F는 효소처리한 인삼 추출물의 결과이다. 효소처리한 인삼 추출물의 경우, 인삼 추출물에서 크게 나타났던 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)계의 Rb1, Rb2, Re, Rd 피크는 거의 사라지고 프로사포제닌(prosapogenin)인 Rg3, Rg2 그리고 이들로부터 생성되는 Rh2, Rh1이 다량으로 생성된 것을 알 수 있다. 더욱이 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)계의 최종대사산물인 IH-901은 Rg2, Rg3와 함께 효소처리 인삼추출물의 주요 성분임을 알 수 있었다. 따라서 본 발명의 조성물 중 베타-글루코시다아제 효소처리한 인삼 추출물은 인삼의 주요성분으로 IH-901과 Rg2, Rg3를 다량 함유한 제제임을 알 수 있고, 이에 따라 본 발명의 조성물의 항당뇨 효과는 IH-901, Rg2, Rg3와 같은 프로사포제닌(prosapogenin)에 기인함을 알 수 있다.

<36> 이하에서는 본 발명의 조성물의 항 당뇨 효능을 확인하기 위해, 상기 실시예에 의해 얻어진 조성물을 이용하여 하기 실험예 2 내지 9를 수행하였다.

<37> 실험예 2 : 체중과 혈당에 대한 효과 실험

<38> 실험동물로서 C57BL/KsJ db/db 5주령의 마우스를 한국 오리엔트사로부터 구입하였으며 1주 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험군은 당뇨 대조군(Diabetic control, 이하 DC), 본 발명의 조성물(이하 GE) 300 mg/kg (GE300), GE 500 mg/kg (GE500) 그리고 양성대조군으로서 메트폴민(metformin) 300 mg/kg (MT300)으로 나누었다. 약물은 경구 투여로 25일간 투여하였으며, 체중과 혈당은 매주 측정하였다.

<39> 측정 결과, 체중의 경우, 당뇨 대조군에 비해 GE 투여군의 체중과 체중 변화에는 거의 차이가 없었으며, MT300 투여 군에서만 체중 증가 둔화 양상이 보였다(도 2 참조). 혈당의 경우, 당뇨 대조군의 혈당이 큰 폭으로 상승한 가운데 GE300과 GE500 투여군 모두에서 25일간의 시료 투여로 인한 혈당 상승의 억제 작용이 나타났다(도 3 참조). 결론적으로, 본 발명의 조성물(GE)은 체중감소 효과는 거의 없지만 탁월한 혈당 강하 작용으로 인해 항

당뇨 활성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.

<40> 실험예 3: 혈당, 인슐린 및 대사성 지표에 대한 효과 실험

<41> 실험동물, 실험군 및 투여 방법은 상기 실험예 2와 같으며, 각종 혈액 지표 분석을 위한 혈액 채취는 12시간 절식 후 실시하였다. 안와 정맥을 통해 얻어진 전혈을 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 혈장을 분석에 사용하였다. 혈중 포도당 농도는 글루코오스 옥시다아제 방법(Trinder method)을 사용하여 측정하였으며 흡광도 측정은 UV 분광 광도계(U-3210, HITACHI; Japan)를 사용하였다. 혈중 인슐린 농도는 마우스 인슐린 ELISA 키트(Shibayagi, Japan)를 구입하여 ELISA 판독기(Labsystems, Finland)로 측정하였다. 혈중 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 그리고 비에스테르화 지방산(NEFA)은 영동제약에서 각 키트(kit)를 구입하여 측정하였다. 혈중 아디포넥틴 농도는 마우스 아디포넥틴 ELISA 키트(Adipogen, Korea)를 구입하여 ELISA 판독기로 측정하였다. 당화 혈색소는 공복 상태의 실험 동물에서 얻어진 전혈을 헤모글로빈 Alc 키트(BioSystem S.A., Spain)를 이용하여 측정하였다.

<42> 측정 결과는 하기 표 1에 구체적으로 나타내었다.

표 1

파라미터	DC	GE300	GE500	MT300
체중(g)	42.3±0.3	41.3±0.6	42.8±1.3	40.7±0.2
식이량(g)	969.1	950.1	964.2	907.5
음수량(ml)	1709	1591	1526	1134
혈당(mM)	26.7±1.7	19.1±2.2	19.4±2.0	11.9±1.5
혈중 인슐린(μU/ml)	262.5±80.6	235.3±7.6	314.3±57.0	164.1±34.5
HOMA-IR	311.1±19.3	214.3±22.5	258.7±33.2	86.6±10.8
HbA1c(%)	6.10±0.13	5.14±0.42	5.25±0.27	4.96±0.06
혈중 아디포넥틴	64.9±5.5	90.3±0.8	83.5±2.3	71.2±1.5
혈중 지질				
TG(mg/ml)	126.7±13.5	135.9±2.1	127.9±10.7	101.2±5.7
NEFA(μEq/리터)	1639.0±114.1	1571.8±108.9	1535.9±129.0	1664.7±36.2
콜레스테롤(mg/ml)	154.6±2.8	141.4±2.2	149.6±13.7	131.1±2.6
HDL-C(mg/ml)	96.4±2.9	107.7±3.4	115.1±7.8	81.7±2.7

<44> 표 1에 나타내었듯이, 우선 체중과 식이량에서는 GE 투여군 모두 당뇨 대조군과 차이가 없었다. 하지만 음수량은 GE 투여군 모두에서 당뇨 대조군에 비해 감소하였다. 혈당 수치에서는 당뇨 대조군의 혈당이 큰 폭으로 상승한 가운데 GE300과 GE500 투여군은 혈당의 상승이 대조군에 비해 각각 42%, 37% 감소하였다. 양성 대조군인 MT300 투여군은 혈당 상승이 대조군에 비해 88% 감소하였다. 인슐린은 세 그룹 모두 수치가 비슷하고 편차가 커서 유의적인 효과는 거의 없었으나 GE300과 MT300 투여군에서 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 인슐린 저항성 지수(HOMA-IR)는 GE300 투여군과 MT300 투여군에서 혈당에서의 큰 차이로 인해 당뇨 대조군보다 각각 31%, 72%의 개선 효과를 나타내었으며, 이와 함께 인슐린 저항성 개선을 나타내는 수치인 혈중 아디포넥틴 수치는 GE300과 GE500 투여군 모두에서 39%, 29% 정도 증가되었다. 당화 혈색소 수치는 GE300과 GE500 투여군에서 각각 1%, 0.9%의 감소가 나타났다. 혈중 지질 농도에서는 GE300 투여군에서 유의적이지는 않으나 NEFA 수치가 당뇨 대조군에 비해 개선되었으며 총 콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤 수치는 유의적으로 개선되어 전반적인 혈중 지질 농도의 개선이 일어났음을 확인하였다.

<45> 상기 결과를 종합하면, 본 발명의 조성물(GE)은 탁월한 혈당 강하 작용을 지니고 있을 뿐만 아니라 인슐린 저항성 개선 효과도 있음을 알 수 있다.

<46> 실험예 4 : 경구 당 부하 시험

<47> 내당능 개선에 대한 본 발명의 조성물(GE)의 작용을 알아보기 위해 GE 투여 종반부에 경구 당 부하 시험을 실시하였다

<48> 실험동물, 실험군 및 투여 방법은 상기 실험예 2와 같으며, 실험동물은 12시간 절식한 다음, 1.5 g/kg의 글루코스를 경구 투여한 후, 0분, 30분, 60분 그리고 120분대에 안와 정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 이후, 5,000

rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻어진 혈장을 이용하여 혈중 포도당 농도와 혈중 인슐린 농도를 측정하였다.

- <49> 측정 결과, 당뇨 대조군에서는 당 부하로 인한 혈당의 급격한 상승이 일어났지만, GE 투여군에서는 당 부하 후의 혈당 상승이 효과적으로 억제되었으며(도 4A 참조), 이로 인해 곡선하 면적 수치 역시 GE300 과 GE500 투여군에서 각각 28%, 21% 유의성 있게 감소하였다(도 4B 참조). 경구 당 부하 시험 기간 동안의 인슐린 수치는 증가하는 경향을 보였으며 특히 당 부하 후 30분대의 인슐린 수치는 GE300 투여군에서 유의성 있게 증가하였다(도 4C 참조).
- <50> 결론적으로, 본 발명의 조성물(GE)의 투여로 인해 내당능이 개선되었으며, 그 효과는 췌장 베타 세포의 기능의 개선과 관련이 있음을 알 수 있다.
- <51> 실험예 5 : 췌장 조직에서 베타세포 항-인슐린 면역염색(anti-insulin immunostaining) 실험
- <52> 췌장 조직에 대한 본 발명의 조성물(GE)의 작용을 알아보기 위해 다음과 같은 방법으로 항-인슐린 면역염색을 실시하였다. 실험동물, 실험군 및 투여 방법은 상기 실험예 2와 같으며, 쥐에서 적출한 췌장 조직을 10% 중성 완충 포르말린(neutral buffered formalin)을 사용하여 고정하였다. 이후 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하고 두께 5 μ m의 관상 절편으로 제작한 후 파라핀 제거와 알코올 친수화 과정을 수행하였다. 친수화된 조직 절편은 0.1% 트립신에 처리한 후, 정상 토끼 혈청 블로킹 용액(normal rabbit serum blocking solution)을 이용하여 상온에서 30분간 블로킹하였다. 이후, 조직을 1차 항체(인슐린)와 상온에서 1시간 반응시키고 3% 과산화수소에서 10분간 반응시켰다. 그 다음, 조직을 2차 항체와 상온에서 30분 반응시킨 후 아비딘-비오틴 복합(avidin-biotin complex) 면역과산화효소 염색(immunoperoxidase staining)을 Vectastain Elite ABC 키트(Vector Laboratories, USA)의 방법에 따라 수행하였다. 이후, DAB 과산화효소 기질 용액(peroxidase substrate solution)을 5-10분간 처리하여 염색을 하였으며, 헤마톡실린을 이용하여 대조 염색을 하였다.
- <53> 측정 결과, 당뇨 대조군에서는 췌장 소도(islet)의 형태가 파괴되고 염증 정도를 나타내는 침윤 단핵 세포가 많이 관찰되었으며 인슐린의 함량이 거의 없었다. 반면 GE 투여군에서는 소도(islet)의 형태가 잘 유지되고 침윤 단핵 세포가 현저히 줄어들었으며, 인슐린의 함량 또한 당뇨 대조군에 비해 많이 보존되어 있었다(도 5 참조).
- <54> 결론적으로, 본 발명의 조성물(GE)이 지닌 혈당 상승 억제, 혈중 지질 농도 개선 효과는 췌장조직에 대한 당독성 (glucotoxicity), 지질독성(lipotoxicity)을 낮추어 췌장 베타 세포의 파괴를 억제하고 인슐린 분비 기능을 증대시키는 것임을 알 수 있다.
- <55> 실험예 6 : 간 조직에 대한 효과 실험
- <56> 간 조직의 형태학적 관찰은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 실험동물, 실험군 및 투여 방법은 상기 실험예 2와 같으며, 쥐에서 적출한 조직을 10% 중성 완충 포르말린(neutral buffered formalin)을 사용하여 고정하였다. 이후 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하고 두께 5 μ m의 관상 절편으로 제작한 후 크실렌으로 파라핀을 제거시키고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화 시켰다. 염색 방법으로는 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin-Eosin) 염색으로 탈수 과정을 거쳐 캐나다 발삼(Canada balsam)으로 봉입하고 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.
- <57> 간 조직에서 중성지방 함량은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 조직 50mg을 CHCl_3 와 MeOH 2:1 혼합 용매 4ml에 담그고 분쇄한 후 50mM NaCl 0.8ml을 첨가하고 혼합하여 4℃에서 12시간 동안 방치하였다. 이후 1,300g에서 5분 동안 원심분리시키고 유기층에서 200 μ l를 취하여 질소가스로 4시간 동안 건조시켰다. 그 후, 트리톤 X 100이 포함된 PBS에 녹여 영동제약에서 구매한 중성지방 측정 키트를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- <58> 측정 결과, 25일간의 시료 투여 후 db/db 마우스의 간 조직 변화는 도 6에 나타내었다. 혈중 지질 농도의 증가는 간조직의 중성 지방 축적을 일으켜 간 무게의 증가를 일으키게 된다. 체중 대비 간 무게 수치는 GE300과 MT300 투여군에서 당뇨 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다(도 6B 참조). 이와 더불어 간 조직 염색 사진에서도 당뇨 대조군에서 많이 발견되는 지방 소적(lipid droplet)이 GE 투여군과 MT300 투여군에서 많이 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 6C 참조). 간 조직에서의 중성 지방 함량은 도 7에 나타내었다. 간에서의 중성 지방 함량은 당뇨 대조군에 비해 GE300과 GE500 투여군 모두에서 유의적으로 감소되었다(도 7 참조).
- <59> 결론적으로, 본 발명의 조성물(GE)은 간 조직에서의 지질 대사에 관여하여 중성 지방의 축적을 감소시키며, 비알콜성 지방간에도 효과가 있을 것임을 알 수 있다.
- <60> 실험예 7 : 간 조직 당대사 관련 효소에 미치는 효과 실험

<61> 본 발명의 조성물이 db/db 마우스의 간 조직에서 당대사 관련 효소인 글루코오스-6-포스파타아제(G6Pase), 글루코키나아제(GK) 그리고 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소(G6PD)의 활성에 미치는 영향을 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

<62> 실험동물, 실험군 및 투여 방법은 상기 실험예 2와 같으며, 글루코오스-6-포스파타아제(G6Pase) 효소 활성 측정을 위해 간 조직을 균질화 버퍼(homogenizing buffer) (0.25M 수크로오스)로 균질화하고 11,000g에서 30분간 원심 분리를 한 후, 그 상등액을 105,000g에서 60분간 더 원심 분리를 하였다. 생성된 침전물은 차가운 수크로오스-EDTA 용액에 녹인 다음, Baginski et al. 등의 방법을 이용하여 측정하였다 (Academic Press, 1974). 글루코키나아제(GK) 효소 활성 측정에는 간 조직을 균질화 버퍼(50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 10 mM mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH 7.4)를 이용하여 균질화한 후, 12,000g에서 60분간 원심분리를 하여 얻은 상등액을 사용하였다. GK 활성은 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase)의 존재하에서 NAD의 감소에 따라 생성되는 글루코오스-6-포스페이트의 양에 의해 측정하였다(Chem. Pharm. Bull. 34, 4731-4737, 1986). 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소(G6PD) 활성의 측정에는 간 조직을 균질화 버퍼(생리 식염수 중 0.66 mM EDTA)로 균질화한 후, 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 이용하여 글루코오스-6-포스페이트의 존재하에서 NAD의 감소에 따라 생성되는 NADPH의 양에 의해 측정하였다(Academic Press, 1970).

<63> 측정 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Parameter	DC	GE300	GE500	MT300
G6Pase (nM/min/mg protein)	96.5 ± 13.7	43.3 ± 40.3	24.9 ± 67.2	39.0 ± 10.4*
GK (nM/min/mg protein)	71.5 ± 3.7	77.1 ± 2.3	69.3 ± 9.6	109.5 ± 6.6**
G6PD (U/g wet tissue)	1.11 ± 0.11	1.77 ± 0.12**	1.67 ± 0.14*	1.59 ± 0.12*

<64>

<65> 표 2에 나타내었듯이, 당 신생에 관여하는 G6Pase 효소의 경우 GE 투여군 모두에서 그 활성이 감소되었다. 이에 반해 해당과정에 관여하는 GK 효소는 GE 투여로 인한 활성 변화가 없었으며, MT300 투여군에서만 그 활성이 증가되었다. 한편, 간에서 당대사의 또 다른 경로인 5탄당 인산 경로(pentose phosphate pathway)에 관여하는 효소인 G6PD의 활성은 GE300과 GE500 투여군에서 각각 59%, 51% 유의적으로 증가되었다. 결론적으로, 본 발명의 조성물(GE)은 간조직에서 당의 신생을 억제하고 5탄당 인산 경로로의 유입을 촉진시킴으로써 혈당 강하 작용에 있어서 부가적인 영향을 나타낼 수 있다.

<66> 실험예 8 : 지방 조직에 대한 효과 실험

<67> 조직의 형태학적 관찰은 상기 실험예 6과 같은 방법으로 수행하였다.

<68> 25일간의 시료 투여 후 db/db 마우스의 지방 조직 변화를 관찰한 결과, GE 투여군과 MT300 투여군에서는 지방 조직의 크기가 당뇨 대조군에 비해 현저하게 줄어들었으며, 특히 GE300 투여군의 경우 매우 큰 차이를 보였다(도 8 참조). 지방세포 크기를 직경 및 면적의 수치로 나타낸 결과, 지방 세포의 직경 분포는 GE 투여군과 MT300 투여군 모두 당뇨 대조군에 비해 직경이 작은 쪽으로 그 분포가 이동되어 있었으며(도 9A 참조), 면적 역시 대조군과 비교하여 GE300과 GE500 투여군에서 각각 42%, 38% 감소되었다(도 9B 참조).

<69> 실험예 9 : 조직의 유전자 발현에 미치는 효과 실험

<70> 본 발명의 조성물이 간, 지방, 근육 조직에서 유전자 발현에 어떠한 변화를 일으키는지 전반적으로 확인하기 위해 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

<71> 실험동물, 실험군 및 투여 방법은 상기 실험예 2와 같으며, 간, 지방, 근육 조직에서 총 RNA는 구아니딘 티오시아네이트-물 포화 페놀/클로로포름(guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform) 분리 방법을 이용하였다(Chomczynski and Sacchi, 1987). 물 층에 있는 총 RNA는 이소프로판올을 이용하여 침전시켜 분리한

RNA는 260 nm 와 280nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

<72> 실시간 PCR은 라이트 사이클러 실시간 PCR 검출 시스템(Roche, Germany)에서 LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I 키트(Roche, Germany)의 방법을 이용하여 수행하였다. 반응은 95℃에서 10분 동안의 전 배양(pre-incubation) 단계를 거친 후, 95℃에서 10초 동안의 변성, 54℃에서 10초 동안의 불임 그리고 72℃에서 8초 동안의 증폭의 3단계로 이루어진 증폭(amplification) 단계를 40회 반복하였다. 특정 산물(specific product)을 판독하기 위한 용융 커브(melting curve) 분석은 65℃에서 95℃로의 온도 변화로부터 측정하였다. 각 목적 유전자의 베타-액틴(β -actin) 유전자에 대한 상대적인 발현 비율은 다음과 같은 반응식에 의해 계산되었다: $2^{-\Delta \Delta C_p}$ 여기서 $\Delta \Delta C_p = \Delta C_{pGE300 \text{ sample}} - \Delta C_{pDC \text{ sample}}$, $\Delta C_{pGE300 \text{ sample}} = C_{pGE300\text{-stimulated target sample}} - C_{pGE300\text{-stimulated } \beta\text{-actin}}$ 그리고 $\Delta C_{pDC \text{ sample}} = C_{pDC \text{ target gene}} - C_{pDC \beta\text{-actin}}$ (Anal. Biochem. 270, 41-49, 1999).

<73> 웨스턴 블롯은 단백질을 분석을 위해 조직을 균질화 버퍼(250 mM sucrose, 5mM Na₃, 2 mM EDTA, 20 mM Hepes)를 이용하여 균질화한 후, 미즈모토(Mitsumoto)와 클리프(Klip)의 방법(J. Biol. Chem. 267, 4957-4962, 1992)을 이용하여 형질막 단백질 추출물(plasma membrane protein extract)을 얻었다. 단백질을 정량은 바이오-라드 분석 시약(Bio-Rad, USA)을 이용하여 측정하였으며, 정량한 단백질 100 μ g을 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 이후, 겔을 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 옮기고 5% 탈지유(skim milk)를 함유하는 TBST(Tris-buffered saline/ Tween 20)와 상온에서 1시간 블로킹하였으며, 1:200 비율로 희석된 1차 항체(GLUT4)와 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 막을 TBST를 이용하여 4번 세척하고, 같은 방법으로 5% 탈지유를 함유하는 TBST와 상온에서 1시간 블로킹한 다음, 1:5000의 비율로 희석된 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후, 같은 방법으로 TBST를 이용하여 4번 세척하고, ECL 용액(Amersham, Sweden)을 이용하여 현상(developing)하였다.

<74> 마이크로어레이 분석은 형광 표지된 cRNA를 증폭하여 사용하며 이 cRNA와 혼성화(hybridization)된 DNA 칩을 GenePix 4000B(Axon Instruments, Union city, CA)를 이용하여 이미지화하여 GenePix Pro 3.0(Axon Instruments, Union city, CA)프로그램으로 분석하였다.

<75> 본 발명의 조성물이 간 조직의 유전자 발현에 어떠한 변화를 일으키는지 확인하기 위해 마이크로어레이를 수행한 결과, 그 중 당뇨와 관련되어 있는 19개의 유전자를 선별하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

Accession No.	Gene name	Fold	Function
<i>Up-regulated</i>			
NM_008826	Phosphofructokinase, liver, B-type	1.52	Glycolysis
NM_144908	Aldolase 2, B isoform	1.68	Glycolysis
NM_013631	Pyruvate kinase liver and red blood cell	1.26	Glycolysis
NM_019811	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	1.40	Glycolysis genesis
NM_010571	Insulin receptor substrate 3	1.57	Insulin signaling
NM_008062	Glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked	1.22	Pentose phosphate pathway
NM_081379	Transketolase-like 1	1.25	Pentose phosphate pathway
BC011329	Phosphogluconate dehydrogenase	1.30	Pentose phosphate pathway
NM_173371	Hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)	1.35	Pentose phosphate pathway
<i>Down-regulated</i>			
L23108	CD36 antigen	0.80	Adipocytokine signaling
NM_013539	Triosephosphate isomerase 1	0.66	Gluconeogenesis
NM_008061	Glucose-6-phosphatase, catalytic	0.78	Gluconeogenesis
NM_007933	Enolase 3, beta muscle	0.72	Glycolysis
NM_025421	Acylophosphatase 1, erythrocyte (common) type	0.71	Glycolysis/gluconeogenesis
NM_007563	2,3-bisphosphoglycerate mutase	0.80	Glycolysis/gluconeogenesis
NM_010292	Gluco kinase	0.83	Glycolysis
NM_145572	Glycogen synthase 2	0.74	Insulin signaling
NM_026662	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2	0.61	Pentose phosphate pathway
NM_009075	Ribose 5-phosphate isomerase A	0.80	Pentose phosphate pathway

<76> 본 발명의 조성물은 주로 해당경로, 5탄당 인산 경로(pentose phosphate pathway)에 관여하는 유전자의 발현을

<77>

증가시켰다. 발현이 감소된 유전자로는 글루코오스-6-포스파타아제 (0.78-fold)가 있었고, 발현이 증가된 유전자로는 포스포프рук토키나아제 (1.52-fold), 알도라아제 2 (1.68-fold) 그리고 글루코오스-6-포스페이트 탈수소 효소 (1.22-fold) 등이 있었다. 이는 상기 실험에 6의 효소 활성 측정 결과와 그 양상이 일치하는 것이며, 결론적으로 본 발명의 조성물의 투여가 간 조직에서 해당 경로, 5탄당 인산 경로에 영향을 끼침으로써 혈당 강하 작용을 일으킴을 알 수 있다.

<78> 한편, 본 발명의 조성물이 db/db 마우스의 지방, 근육 조직에서 글루코오스 흡수(glucose uptake)에 관여하는 GLUT4 유전자 및 PPAR γ 유전자의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR을 이용하여 측정한 결과는 도 10에 나타내었다. 지방 조직에서는 GLUT4의 발현이 GE500 투여군에서 대조군에 비해 뚜렷하게 증가되었고, PPAR γ 유전자 발현은 GE300과 GE500 투여군 모두에서 대조군에 비해 그 발현이 증가되었다(도 10A 참조). 근육 조직의 경우는 GE300 투여군에서 GLUT4 유전자의 발현이 대조군에 비해 증가되었다(도 10B 참조).

<79> 지방, 근육 조직에서의 GLUT4 발현을 웨스턴 블랏(western blot)을 이용하여 분석한 결과는 도 11에 나타내었다. 나타낸 그림이다. 웨스턴 블랏의 결과 역시 상기 RT-PCR에서의 결과와 마찬가지로 지방 조직에서는 GE500 투여군에서 GLUT4 발현이 약간 증가되었으며, 근육 조직에서는 GE300과 GE500 투여군 모두 대조군에 비해 발현이 약간 증가되는 경향을 나타내었다. MT300 투여군의 경우 지방, 근육 조직 모두에서 그 발현이 모두 당뇨 대조군에 비해 증가되었다. 이러한 결과로써 본 발명의 조성물의 혈당 강하 활성과 인슐린 저항성 개선 활성을 확인할 수 있다.

<80> 한편, 본 발명의 조성물이 지방 조직의 유전자 발현에 어떠한 변화를 일으키는 지 확인하기 위해 마이크로어레이를 수행한 결과, 그 중 당뇨와 관련되어 있는 22개의 유전자를 선별하여 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

Accession No.	Gene name	Fold	Function
Up-regulated			
NM_009204	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	1.84	Adipocytokine signaling
AK036535	Protein kinase, AMP-activated, gamma3 non-catalytic subunit	1.60	Adipocytokine signaling
L23103	CD36 antigen	1.42	Adipocytokine signaling
NM_009949	Carnitine palmitoyltransferase 2	1.30	Adipocytokine signaling
AK050346	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	1.49	Adipocytokine signaling
NM_009605	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing	1.64	Adipocytokine signaling
NM_173143	Protein kinase, AMP-activated, alpha2 catalytic subunit	1.28	Adipocytokine signaling
NM_011146	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	1.27	Adipocytokine signaling
NM_133369	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	1.39	Fatty acid biosynthesis
BC022940	Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	2.18	Fatty acid biosynthesis
NM_007933	Fatty acid synthase	2.04	Fatty acid biosynthesis
NM_009127	Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	1.21	Fatty acid biosynthesis
NM_007332	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	1.31	Fatty acid metabolism
NM_009949	Carnitine palmitoyltransferase 2	1.30	Fatty acid metabolism
NM_007333	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	1.35	Fatty acid metabolism
BC006692	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	1.78	Fatty acid metabolism
Down-regulated			
NM_144323	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	0.70	Adipocytokine signaling
NM_023317	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	0.73	Adipocytokine signaling
NM_007410	Alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	0.54	Fatty acid metabolism
NM_007437	Aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2	0.60	Fatty acid metabolism
NM_010011	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10	0.62	Fatty acid metabolism
NM_144323	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	0.70	Fatty acid metabolism

<81> 본 발명의 조성물은 주로 아디포사이토카인 신호전달 경로(adipocytokine signaling pathway), 지방산 생합성/대사 경로에 관여하는 유전자의 발현에 영향을 끼쳤다. 아디포사이토카인 신호전달 경로에 관련된 유전자로는 PPAR γ (1.27-fold), GLUT4 (1.84-fold) 그리고 CD36 (1.42-fold) 등이 있었으며, 지방산 합성/대사 경로에 관련된 유전자로는 FAS (2.04-fold), SCD-1 (1.21-fold) 등이 있었다. 결론적으로, 본 발명의 조성물은 지방조직

생성(adipogenesis)을 통한 지방 세포의 분화, 또한 그로 인한 GLUT4 유전자의 발현 증가를 일으킬 수 있음을 알 수 있다.

발명의 효과

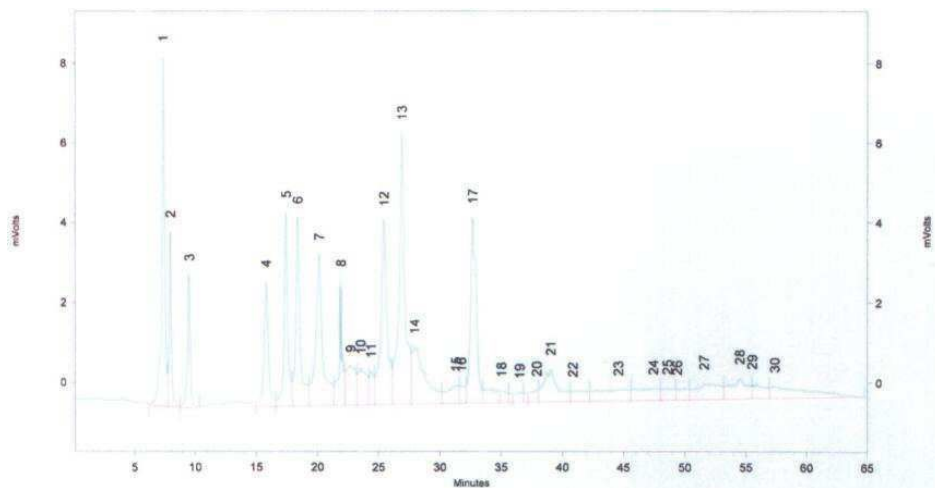
- <83> 상술한 바와 같이 본 발명의 조성물은 우수한 혈당 강하 작용을 지니고 있을 뿐만 아니라 인슐린 저항성 개선 효과, 혈중 지질 농도 개선 효과 등을 나타내므로, 당뇨병 및 이로 인한 합병증의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.
- <84> 즉, 본 발명의 조성물은 기존의 당뇨치료제와는 달리 여러 가지 기전에 의해 효능을 나타내므로, 인슐린 분비 장애와 인슐린 저항성을 동시에 지니고 있는 제 2형 당뇨 환자에 특히 유용하며, 췌장 베타세포의 기능부전, 고지혈증 등에 기인한 당뇨 합병증의 예방 및 치료에도 유용하게 이용될 수 있다.
- <85> 또한 부작용이 적은 천연물 제제의 특성상 당뇨 전 단계 혹은 초기 당뇨환자를 대상으로 기존의 당뇨치료제에 비해 안전하면서도 효과는 우수한 제품으로 사용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1A 내지 1F는 인삼 추출물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.
- <2> 도 2는 25일간의 시료 투여 기간 동안 체중의 변화 양상을 나타낸 것이다.
- <3> 도 3은 25일간의 시료 투여 기간 동안 혈당의 변화 곡선을 나타낸 것이다.
- <4> 도 4는 시료 투여 중반부에 경구 당 부하 시험을 실시한 결과를 나타낸 것이다.
- <5> 도 5는 25일간의 시료 투여 후 췌장 조직의 형태 변화를 나타낸 것이다.
- <6> 도 6은 25일간의 시료 투여 후 간 조직 변화를 나타낸 것이다.
- <7> 도 7은 25일간의 시료 투여 후 간 조직에서의 중성 지방 함량을 그래프로 나타낸 것이다.
- <8> 도 8은 25일간의 시료 투여 후 지방 조직 변화를 나타낸 것이다.
- <9> 도 9는 도 8의 지방세포 크기를 직경 및 면적의 수치로 나타낸 것이다.
- <10> 도 10은 지방, 근육 조직에서의 GLUT4 유전자 및 PPAR γ 유전자의 발현을 RT-PCR을 이용하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- <11> 도 11은 지방, 근육 조직에서의 GLUT4 유전자의 발현을 웨스턴 블랏을 이용하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도면

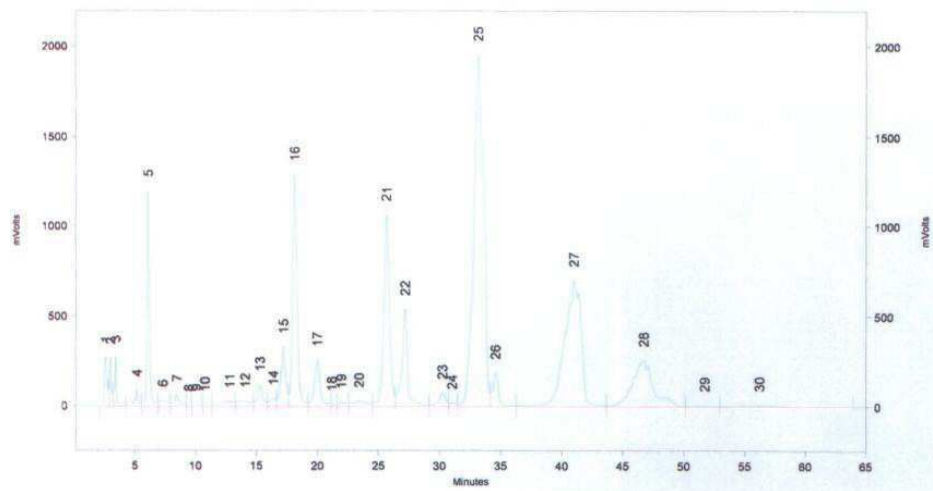
도면1a



도면1b

ELSD Results						
PK #	Name	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	IH-901	7.416	151774	7.37	8797	14.21
2	Rh2	7.983	56472	2.74	4380	7.08
3	Rh1	9.516	51538	2.50	3318	5.36
4	Rg2	15.816	75006	3.64	3140	5.07
5	Rg3	17.449	102879	4.99	4855	7.84
6	Rg1	18.399	120503	5.85	4717	7.62
7	Rf	20.149	150386	7.30	3784	6.11
8		21.932	55635	2.70	3123	5.04
9		22.715	52354	2.54	973	1.57
10		23.532	46816	2.27	918	1.48
11		24.398	20916	1.02	823	1.33
12	Re	25.465	164788	8.00	4614	7.45
13	Rd	26.932	233462	11.33	6780	10.95
14		27.948	106569	5.17	1410	2.28
15		31.315	29818	1.45	445	0.72
16		31.748	14054	0.68	437	0.71
17	Rc+Rb2	32.698	156371	7.59	4647	7.51
18		35.031	11187	0.54	298	0.48
19		36.514	11082	0.54	254	0.41
20		37.914	13179	0.64	302	0.49
21	Rb1	39.048	67343	3.27	813	1.31
22		40.864	24491	1.19	275	0.44
23		44.597	53769	2.61	293	0.47
24		47.447	40950	1.99	301	0.49
25		48.597	20902	1.01	303	0.49
26		49.380	18372	0.89	283	0.46
27		51.580	55799	2.71	398	0.64
28		54.497	52057	2.53	521	0.84
29		55.530	27155	1.32	394	0.64
30		57.363	74773	3.63	310	0.50
Totals			2060400	100.00	61906	100.00

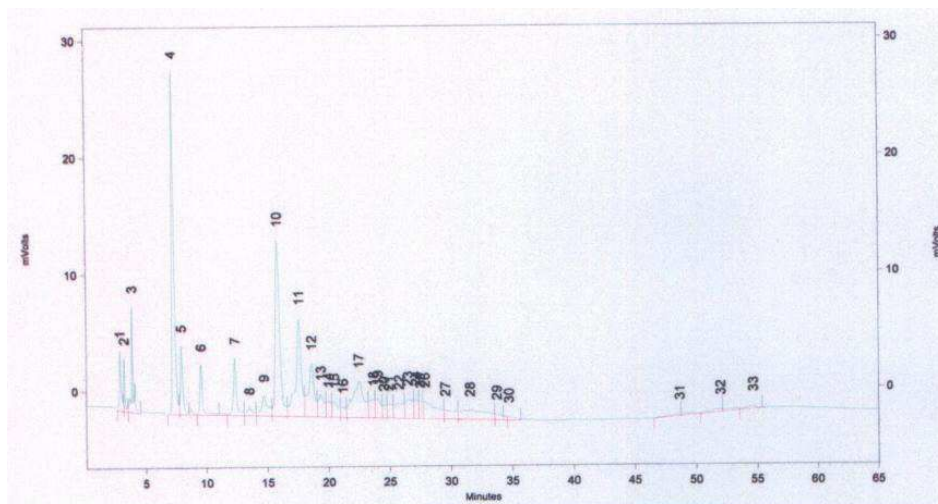
도면1c



도면1d

ELSD Results						
Pk #	Name	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	Rh2	2.583	3876959	1.06	276508	3.01
2		3.000	3155237	0.86	268230	2.92
3		3.433	2941838	0.81	278811	3.04
4		5.166	1244196	0.34	88121	0.96
5		6.100	18064793	4.95	1197584	13.06
6		7.316	1153267	0.32	31723	0.35
7		8.466	1475954	0.40	60181	0.66
8		9.466	117077	0.03	4633	0.05
9		10.049	290464	0.08	6739	0.07
10		10.783	201216	0.06	4972	0.05
11	Rg2	12.816	1644960	0.45	24217	0.26
12		14.082	1811800	0.50	26786	0.29
13		15.299	3414232	0.94	118036	1.29
14		16.382	1321672	0.36	40276	0.44
15	Rg3	17.232	9206061	2.52	330561	3.60
16	Rgl	18.149	33620808	9.22	1289428	14.06
17	Rf	19.999	8338315	2.29	257609	2.81
18		21.165	225913	0.06	8219	0.09
19		21.965	815669	0.22	22143	0.24
20		23.415	2128343	0.58	27961	0.30
21	Re	25.682	33863221	9.28	1061168	11.57
22	Rd	27.198	17733983	4.86	541269	5.90
23		30.248	2732634	0.75	74462	0.81
24		31.031	658883	0.18	18817	0.21
25		33.198	110049044	30.17	1953556	21.30
26	Rc+Rb2	34.598	6389460	1.75	184801	2.02
27		40.997	65490520	17.95	699024	7.62
28		46.730	30449821	8.35	257863	2.81
29		51.713	624415	0.17	7051	0.08
30		56.213	1740977	0.48	10464	0.11
Totals			364781732	100.00	9171213	100.00

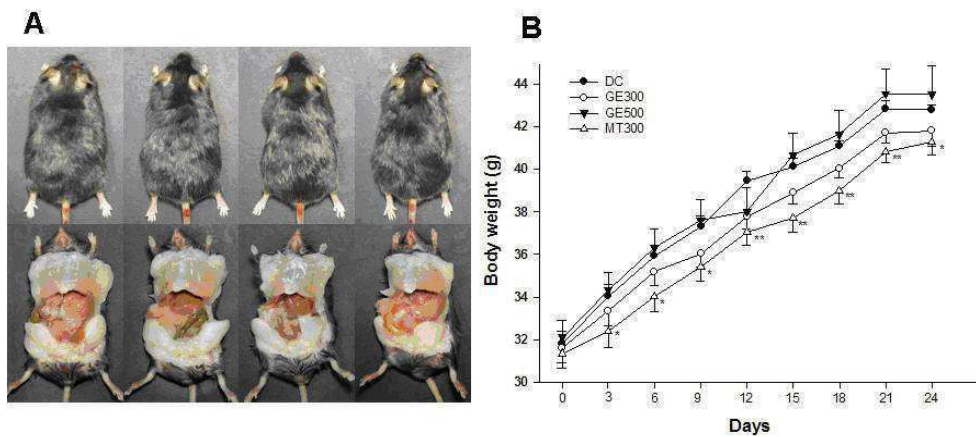
도면1e



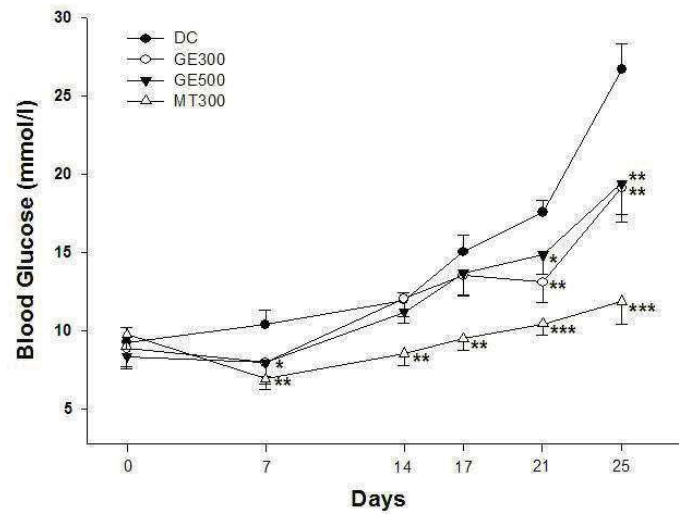
도면1f

ELSD Results						
Plk #	Name	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1		2.916	46714	1.77	5027	4.32
2		3.250	27066	1.03	4454	3.82
3		3.916	78558	2.98	8995	7.72
4	IH-901	7.350	372225	14.11	29282	25.15
5	Rh2	7.983	76140	2.89	5798	4.98
6	Rh1	9.583	55223	2.09	4215	3.62
7		12.366	74132	2.81	4851	4.17
8		13.532	17932	0.68	568	0.49
9		14.732	56770	2.15	1674	1.44
10	Rg2	15.866	370043	14.03	15023	12.90
11	Rg3	17.616	255223	9.68	8346	7.17
12	Rg1	18.632	151937	5.76	4473	3.84
13		19.382	62805	2.38	1878	1.61
14	Rf	19.982	34008	1.29	1292	1.11
15		20.465	42844	1.62	1242	1.07
16		21.165	22712	0.86	806	0.69
17		22.465	192102	7.28	2997	2.57
18		23.648	48193	1.83	1498	1.29
19		24.032	47231	1.79	1579	1.36
20		24.532	26228	0.99	1074	0.92
21	Re	24.932	32445	1.23	1150	0.99
22		25.765	62066	2.35	1221	1.05
23	Rd	26.482	64911	2.46	1547	1.33
24		27.115	39991	1.52	1580	1.36
25		27.482	26466	1.00	1409	1.21
26		27.882	107499	4.08	1449	1.24
27		29.548	44949	1.70	710	0.61
28		31.548	115104	4.36	747	0.64
29		33.731	17783	0.67	499	0.43
30		34.731	11602	0.44	277	0.24
31		48.664	14290	0.54	205	0.18
32		51.997	21895	0.83	280	0.24
33		54.680	20244	0.77	304	0.26
Totals			2637331	100.00	116450	100.00

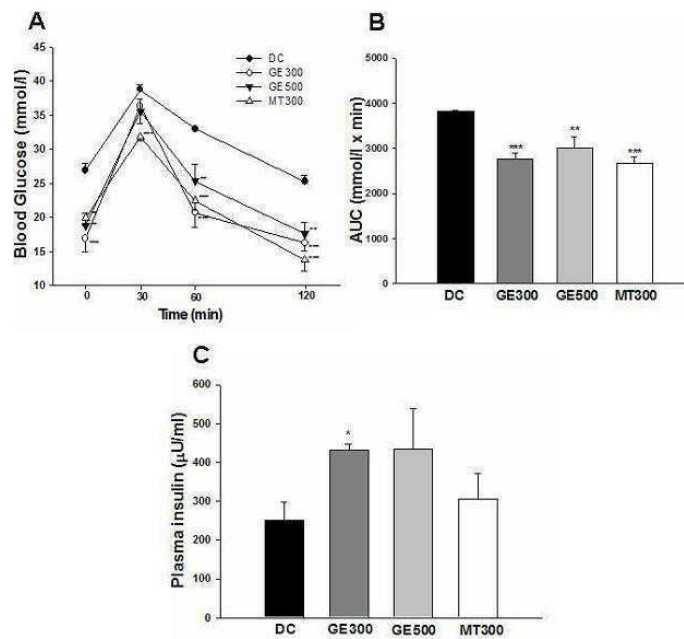
도면2



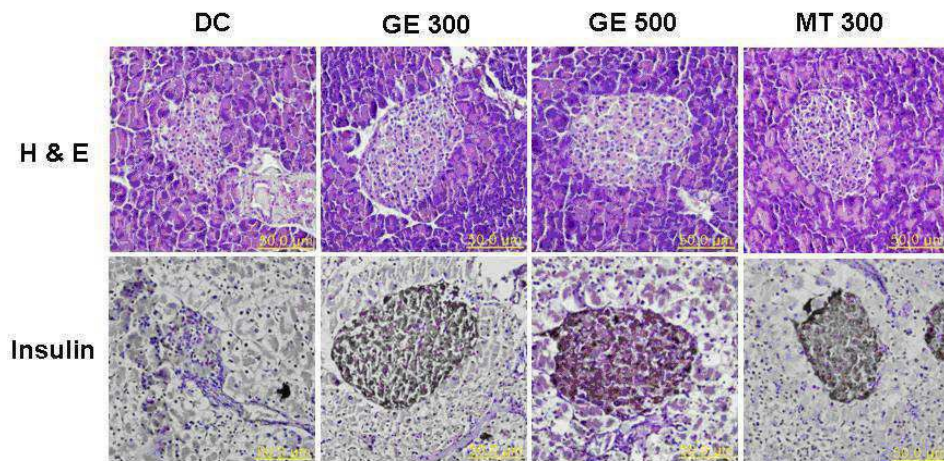
도면3



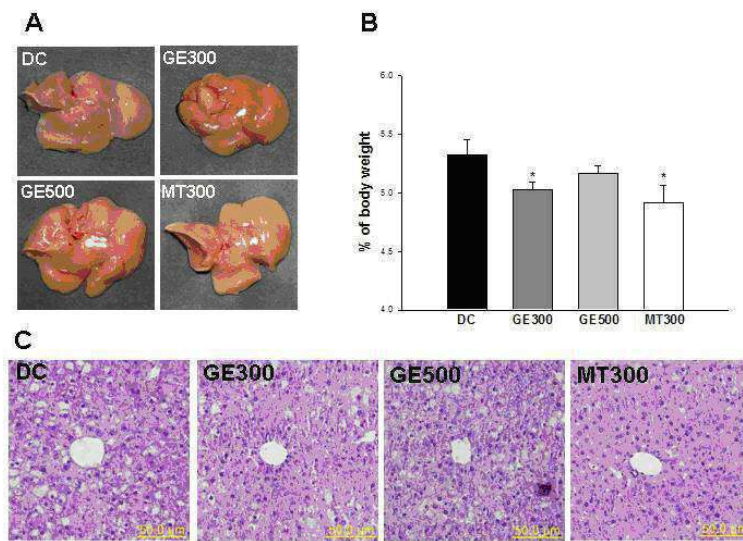
도면4



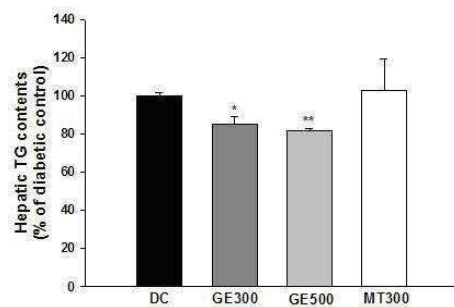
도면5



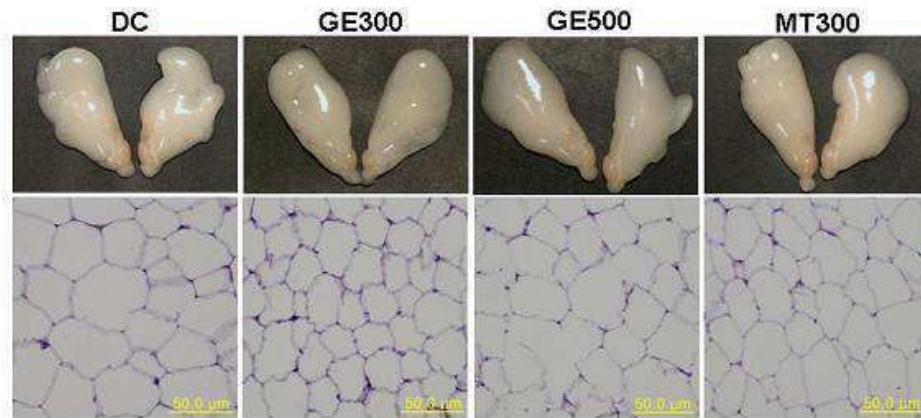
도면6



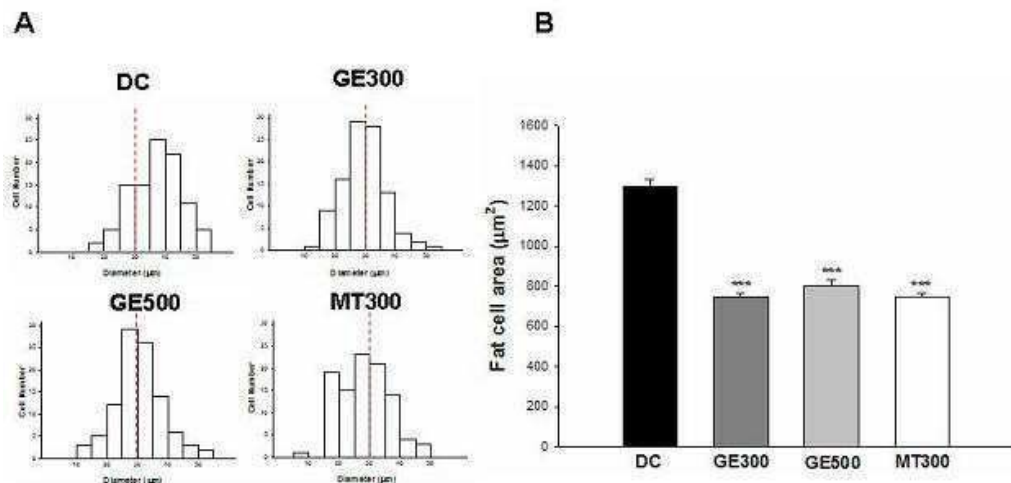
도면7



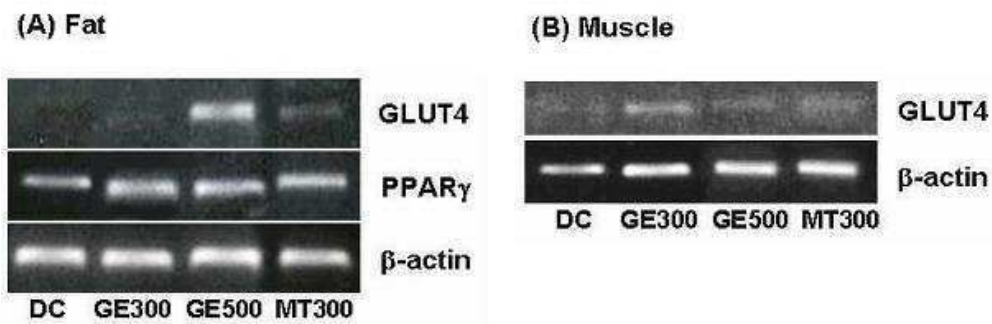
도면8



도면9



도면10



도면11

